

Tânia Marisa Macedo Pinheiro

A Importância Clínica da Vitamina D



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Tânia Marisa Macedo Pinheiro

A Importância Clínica da Vitamina D



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Tânia Marisa Macedo Pinheiro

A Importância Clínica da Vitamina D

Atesto a originalidade do trabalho

(Assinatura)

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas”

Sumário

Nos últimos anos, o papel fisiológico da vitamina D tem sido amplamente estudado. A sua ação primordial no metabolismo do cálcio é já bem conhecida, sendo esta uma das hormonas responsáveis pela manutenção dos níveis de cálcio sérico, através da promoção da absorção de cálcio e fósforo a partir do intestino e da reabsorção óssea de cálcio. No entanto, o interesse clínico na vitamina D não se restringe apenas ao metabolismo fosfocálcio, mas também se manifesta em várias outras condições médicas (diabetes, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla, câncer, distúrbios psiquiátricos, doenças neuro-muscular). De facto, evidências recentes correlacionam níveis insuficientes de vitamina D, com um risco aumentado de desenvolvimento de outras doenças, não relacionadas com a componente óssea.

A elevada prevalência de níveis inadequados de vitamina D é hoje em dia encarada como um problema de saúde pública que afeta vários países da Europa e os EUA. Por este motivo, e pelo conhecimento do crescente número de doenças associadas a esta deficiência, a medição exata dos níveis de vitamina D tem assumido elevada relevância na clínica. Desta forma, o número de análises para avaliação da quantidade de vitamina D para fins de diagnóstico aumentou significativamente. A concentração de 25-hidroxitamina D (25(OH)D) é o parâmetro de rotina, mas a determinação de outros metabolitos, em particular a forma fisiologicamente ativa 1,25 dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D) pode ser também de interesse clínico. No entanto, os níveis séricos de 25(OH)D são o melhor indicador do conteúdo corporal de vitamina D, uma vez que reflete a quantidade obtida a partir da ingestão e exposição à luz solar, assim como da conversão de vitamina D a partir de depósitos de gordura no fígado. As últimas orientações da *Endocrine Society* sugerem o rastreio do défice de vitamina D apenas em indivíduos em risco e não na população em geral. Nestes doentes, recomenda-se a medição da 25(OH)D sérica circulante, por um método analítico fiável.

Ao longo dos anos, técnicas de quantificação de 25(OH)D e a 1,25(OH)D têm aumentado e evoluído. Estes métodos são baseados em ensaios de ligação competitiva por meio de imunoensaio e cromatografia líquida associados com espectrometria de massa, no entanto estes têm demonstrado vários desafios analíticos, sendo que as vantagens e desvantagens de cada método mudam constantemente com novos desenvolvimentos tecnológicos. Os imunoensaios continuam a ser o modo predominante de medição para 25(OH)D, embora

os problemas com a recuperação equimolar dos metabolitos D₂ e D₃ permanecem um problema.

O déficit de vitamina D é definido por um valor de 25(OH)D inferior a 20 ng/mL (50 nmol/L). Em indivíduos em risco recomenda-se a ingestão de vitamina D na dieta, de acordo com a idade e situações especiais (gravidez, amamentação, obesidade e toma concomitante de alguns fármacos). Para o tratamento e prevenção do déficit de vitamina D sugere-se a utilização de qualquer das isoformas de vitamina D (o colecalciferol ou vitamina D₃ e o ergocalciferol ou vitamina D₂, em dose dependente do grupo etário e das necessidades específicas.

Palavras-chave: Vitamina D, 25-hidroxivitamina D, 1,25-dihidroxivitamina D, avaliação laboratorial.

Abstract

In recent years, the physiological role of vitamin D have been widely studied intensively. Its primary action on the calcium metabolism is well known, this being one of hormones responsible for the maintenance of serum levels of calcium, by promoting calcium and phosphorus absorption from the intestine and from bone calcium resorption. However, clinical interest in vitamin D is not restricted to the fosfocalcium metabolism but also is affects several other medical conditions (diabetes, cardiovascular disease, multiple sclerosis, cancer, psychiatric disorders, neuro-muscular disease). In fact, recent evidences correlates insufficient levels of vitamin D with an increased risk of developing other diseases, not related to bone component.

The high prevalence of inadequate vitamin D levels is nowadays seen as a public health problem that affects several countries in Europe and the USA. For this reason, and the knowledge of the growing number of diseases associated with this deficiency, the exact measurement of vitamin D levels has assumed great relevance in the clinic practice. Thus, the number of assays to determine circulating vitamin D for diagnostic purposes has increased significantly.

Circulating 25 hydroxyvitamin D (25 (OH)D) concentration is routinely used, but measurement of other metabolites, especially the physiologically active 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25 (OH)₂D), are of clinical value. However, serum levels of 25(OH)D are the best indicator of vitamin D body content, as it reflects the vitamin obtained from dietary intake and exposure to sunlight, as well as the conversion of vitamin D from fatty deposits in liver. The latest Endocrine Society guidelines suggest screening for vitamin D deficiency only in individuals at risk and not in the general population. In these patients, it is recommended the measurement of 25(OH)D circulating in serum, by a reliable analytical method.

Over the years, the development of the methods to quantify 25(OH)D and 1,25 (OH)₂D have increased and evolved. These method are based in competitive binding assays through to immunoassay and liquid chromatography aligned to mass spectrometry, however these have demonstrated various analytical challenges, the advantages and disadvantages of each method are constantly changing with new technological developments. Immunoassay remains the predominant mode of measurement for

25(OH)D although problems with equimolar recovery of the D₂ and D₃ metabolites remain an issue.

The vitamin D deficiency is defined by a value of 25 (OH) D lower than 20 ng/mL (50 nmol/L). In individuals at risk, the intake of dietary vitamin D according to the age and special medical conditions is recommended (pregnancy, breastfeeding, obesity and concomitant intake of drugs). For treatment and prevention of vitamin D deficiency it is suggested the use of any of the isoforms (cholecalciferol or vitamin D₃ and ergocalciferol or vitamin D₂) in an age-dependent and individual dose.

Key words: Vitamin D, 25-hydroxyvitamin D, 1,25 dihydroxy vitamin D, Laboratory assessment.

Agradecimentos

No vencer de mais uma etapa da minha vida não poderia deixar de referir as pessoas que tanto me ajudaram neste percurso de intensa aprendizagem.

Esta dissertação não representa apenas extensas horas de trabalho mas representa também todas as pessoas que atravessaram o meu percurso académico.

Queria agradecer à Universidade Fernando Pessoa por me ter proporcionado a minha formação profissional. Muito obrigada pela oportunidade.

Queria agradecer á minha orientadora, Professora Doutora Renata Souto e á minha coorientadora Professora Doutora Adriana Pimenta por todo o apoio, disponibilidade e atenção que demonstrou. A forma como orientou, procurando sempre resolver as dificuldades que foram surgindo, foi essencial para a execução deste trabalho. O meu sincero obrigado.

A todos os meus amigos, principalmente a Sara, por toda a força e apoio demonstrado, um obrigado.

À minha família por toda a força e incentivo, principalmente à minha mãe, que esteve presente nos momentos mais complicados, um grande OBRIGADO.

Por ultimo um obrigado a todos os meus colegas de trabalho pelas trocas que fizeram comigo para que esta etapa da minha vida fosse concluída.

Índice

Sumário.....	V
Abstract.....	VII
Agradecimentos.....	IX
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas	XIII
Abreviaturas.....	XIV
I – Introdução.....	1
1. Metodologia.....	3
II – Desenvolvimento	5
1. História e descoberta da vitamina D	5
2. Caracterização físico-química da vitamina D e seus derivados.....	6
3. Fontes de obtenção de Vitamina D	7
4. Metabolismo da vitamina D.....	11
5. Funções da vitamina D	15
6. Relação entre a Vitamina D e determinadas patologias/situações clínicas.....	19
6.1. Vitamina D e Cancro.....	19
6.2. Vitamina D e Doenças cardiovasculares.....	22
6.3. Vitamina D e Diabetes <i>mellitus</i>	27
6.4. Vitamina D e Obesidade	30
6.5. Vitamina D e Esclerose Múltipla	31
6.6. Vitamina D e Risco de Quedas/Fraturas	33
7. Deficiência em Vitamina D	36
7.1. Definição e Epidemiologia.....	36
7.2. Fatores de risco /causas	38
7.3. Sintomas/ Consequências associadas à deficiência em Vitamina D	39

7.4. Tratamento da Deficiência em Vitamina D.....	40
8. Métodos laboratoriais para o doseamento de vitamina D.....	44
7.5. Doseamento dos níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH) ₂ D	45
9. Toxicidade e Hipersensibilidade à vitamina D.....	52
10. Recomendações atuais de vitamina D	53
10.1. Procedimento Diagnóstico.....	53
10.2. Recomendações dietéticas de ingestão de vitamina D para indivíduos em risco de deficiência de vitamina D	54
10.3. Estratégias de Tratamento e Prevenção	56
10.4. Benefícios não calcêmicos da vitamina D.....	57
IV – Conclusão	58
V – Referências Bibliográficas.....	60

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura química da (A) vitamina D ₂ (ergocalciferol) e da (B) vitamina D ₃ (colecalciferol) (retirado de Barral <i>et al.</i> , 2007).....	7
Figura 2 – Produção de vitamina D (retirado de Fraser & Milan, 2013)	19
Figura 3 - Hidroxilação renal e extra-renal de 25 (OH)D (adaptado de Leventis & Patel., 2008).....	15
Figura 4 - Mecanismos envolvidos na regulação dos níveis séricos de cálcio e fósforo (retirado de Urrutia-Pereira <i>et al.</i> , 2015).....	16
Figura 5 – Funções não-esqueléticas da vitamina D (retirado de Urrutia-Pereira <i>et al.</i> , 2015).....	17

Índice de Tabelas

Tabela I – Proporções de vitamina D (D ₂ e D ₃) presentes nas várias fontes (adaptado de Pereira & Almeida, 2008 e Lichtenstein <i>et al.</i> , 2013).....	10
Tabela II – Principais causas de deficiência em vitamina D (adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2013; Bosomworth, 2011; Premaor & Furlanetto, 2006; Urrutia-Pereira & Solé, 2015).....	38
Tabela III - Fármacos disponíveis em Portugal com associações entre a vitamina D ₃ e outras substâncias.....	42
Tabela IV – Fármacos disponíveis em Portugal utilizados na suplementação de vitamina D e algumas das suas características (adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2013).....	43
Tabela V - Métodos diretos de deteção de 25-hidroxivitamina D: vantagens e limitações (adaptado de Fraser & Milan, 2013; Wallace <i>et al.</i> , 2010).....	51
Tabela VI – Tabela VI – Indicações para a ingestão de vitamina D em indivíduos de risco sugeridas pela <i>Endocrine Society</i> (adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2013; Holick <i>et al.</i> , 2011).....	54
Tabela VII – Doses diárias máximas recomendadas pela <i>Endocrine Society</i> para cada faixa etária (adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2013; Holick <i>et al.</i> , 2011).....	56

Abreviaturas

25 (OH)D – 25-hidroxivitamina D, 25-hidroxicolecalciferol ou calcidiol

1,25 (OH)₂D – 1,25-dihidroxivitamina D, 1,25-dihidroxicolecalciferol ou calcitriol

CPBA – Ensaios de Ligação Competitiva às Proteínas, do inglês *Competitive Protein-Binding Assays*

CYP – Citocromo, do inglês *Cytochrome*

DBP – Proteína de Ligação da Vitamina D, do inglês *vitamin D Binding Protein*

IMC – Índice de Massa Corporal

DCV – Doença Cardiovascular

DDR – Dose Diária Recomendada

DGS – Direção Geral de Saúde

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HTA – Hipertensão Arterial

INTERSALT – Grupo de estudo cooperative Intersalt, do inglês *Intersalt Cooperative Research Group*

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

MS – Espectrometria de Massa, do inglês *Mass Spectrometry*

NHANES - estudo NHANES do inglês *National Health and Nutrition Survey*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PTH – Hormona da Paratiroideia, do inglês *Parathyroid hormone*

RIA – Radioimunoensaio, do inglês *Radioimmunoassay*

SNC – Sistema Nervoso Central

UI – Unidades Internacionais

UVB - Radiação Ultravioleta do tipo B

VDR – Recetor da vitamina D, do inglês *vitamin D receptor*

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

I – Introdução

As vitaminas são compostos orgânicos que desempenham um papel crucial em inúmeras funções biológicas (Ferreira, 2005). Estes compostos pertencem a um grupo de nutrientes, mais precisamente aos micronutrientes, de extrema importância para normal funcionamento dos organismos, mesmo quando presentes em pequenas quantidades (na ordem dos miligramas) (Pereira & Almeida, 2008; Ferreira, 2005).

A palavra vitamina foi utilizada pela primeira vez em 1912, pelo bioquímico polaco Casimir Funk, derivando do latim *vita* (vida) e do termo químico – *amina*. Nos primeiros tempos esta designação era atribuída a todas as substâncias que possuíam na sua constituição grupos funcionais amina. No entanto, com o decorrer dos anos, e face à pesquisa realizada acerca destes compostos, verificou-se que nem todas as substâncias presentes neste grupo possuíam grupos funcionais amina, contudo o termo manteve-se até hoje. Este termo caracteriza assim, um grupo de micronutrientes que obedecem aos seguintes critérios:

- Serem compostos orgânicos com características diferentes dos lípidos, glícidos e das proteínas;
- Não serem sintetizados pelo organismo em quantidades suficientes para satisfazerem as diversas funções biológicas do organismo, sendo por isso considerados compostos essenciais;
- A sua carência provocar uma síndrome de deficiência específica (Pereira & Almeida, 2008; Silva, 2007).

Apesar de ajudar na identificação dos compostos, a definição anterior apresenta algumas limitações. Uma das mais evidentes prende-se com a heterogeneidade química e/ou funcional que estes compostos apresentam (Pereira & Almeida, 2008, 2008). Em termos de solubilidade estes compostos podem ser classificados em hidrossolúveis ou lipossolúveis. Já ao nível funcional, algumas atuam como co-factores ou coenzimas, outras apresentam ações antioxidantes e outras, como a vitamina D, desempenham funções mais pleiotrópicas sobre o metabolismo (Ferreira, 2005; Pereira & Almeida, 2008).

Ao longo do tempo, verificou-se que dietas pobres nestes compostos eram a causa de algumas patologias no ser humano, das quais são exemplo escorbuto, pelagra, beribéri e raquitismo. Estas eram patologias associadas a défices de vitaminas, extremamente comuns e associadas a elevadas taxas de mortalidade em tempos passados. No entanto, devido à evolução científica ao nível dos seus mecanismos de ação destes compostos e também devido ao aumento do consumo de alimentos integrais e/ou suplementos, a situação anterior inverteu-se, passando estas patologias a ser raras na grande maioria dos países.

Neste trabalho abordar-se-á a vitamina D, uma vitamina que se encontra integrada no grande grupo dos micronutrientes. Ao longo dos últimos anos, a vitamina D e, em particular, o seu papel fisiológico tem sido alvo de inúmeros estudos. As suas ações fisiológicas ao nível do metabolismo ósseo são extensamente conhecidas, sendo uma das hormonas com papel fundamental na manutenção dos níveis de cálcio sérico, exercendo essa ação através da promoção da absorção de cálcio e fósforo a partir do intestino e da reabsorção óssea de cálcio (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013). No entanto, estudos mais recentes indicam que o seu papel fisiológico não se restringe ao metabolismo ósseo, estando associado a outras situações clínicas como, por exemplo, a diabetes, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla, cancro, distúrbios psiquiátricos, doença neuro-musculares (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013).

Atualmente, em muitos países desenvolvidos, tem-se verificado um aumento da suplementação com vitamina D de inúmeros produtos alimentares. Esta situação prende-se com o facto de se verificar um aumento da deficiência desta vitamina, devido a inúmeros fatores, dentro dos quais se destacam:

- Alterações ao nível dos hábitos alimentares;
- Menor exposição solar, devido a alterações do estio de vida;
- Utilização de vestuário que preenche grande percentagem da pele;
- Cor de pele (quantidade de melanina)
- Idade (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013).

A deficiência desta vitamina pode conduzir a diversos malefícios para a saúde humana, nomeadamente a nível ósseo (deformações da estrutura óssea) e hiperparatiroidismo secundário (Wimalawansa, 2012). Assim, a suplementação com

vitamina D, como forma de satisfazer as suas necessidades diárias, torna-se crucial principalmente em populações em que existe uma ingestão insuficiente de vitamina D. A dose diária recomendada (DDR) de vitamina D indicada para Portugal é de 5 µg/dia (Alves *et al.*, 2013).

1. Metodologia

O papel fisiológico da vitamina D no metabolismo do cálcio é já bem conhecido. No entanto, hoje em dia, sabe-se que a sua função vai muito além do metabolismo fosfocálcio, estando implicada em várias outras situações clínicas.

Neste sentido, foi desenvolvida a presente revisão bibliográfica, tendo como objetivo principal identificar a importância clínica da vitamina D para a garantia do normal funcionamento do organismo humano. Com esta revisão bibliográfica pretendeu-se explorar pormenorizadamente a fisiologia e metabolismo da vitamina D, bem como conhecer o seu papel na saúde/doença. Além disso foram objeto de estudo as causas subjacentes ao elevado número de casos de deficiência desta vitamina verificados na sociedade atual. Por fim, pretendeu-se ainda avaliar as características de um método fiável para o seu doseamento, bem como discutir os problemas e as controvérsias em torno dos testes laboratoriais disponíveis no mercado.

Para a concretização deste trabalho e, no sentido de responder ao objetivo proposto foi efetuada uma análise, avaliação crítica e integração da literatura publicada sobre a temática em causa. Esta revisão de literatura foi elaborada a partir da pesquisa de artigos científicos que se relacionassem com a temática em causa, em diferentes bases de dados, tais como *Pubmed*, *Science Direct*, *B-on*, utilizando como palavras-chave: “*vitamin*”, “*vitamin D*”, “*metabolism*”, “*deficiency*”, “*patology*”, “*cardiovascular diseases*”, “*cancer*”, “*diabetes*”, “*obesity*”, “*metabolic diseases*”, “*treatment*” e outras, na sua generalidade combinadas entre si. Foram também incluídas informações de livros e publicações de organizações oficiais, tais como a DGS (Direção Geral de Saúde), Infarmed ou WHO (*World Health Organization*).

A pesquisa bibliográfica foi realizada entre janeiro e julho de 2015, sendo selecionados apenas os artigos que tinham interesse para os objetivos propostos. Desta

forma, foram estabelecidos alguns critérios de inclusão e exclusão de artigos para a referida revisão bibliográfica. Os critérios de inclusão usados foram artigos originais e de revisão que abordassem a temática em estudo, e publicados na língua portuguesa, inglesa ou espanhola. Por outro lado, foram excluídos artigos e revisões bibliográficas ou sistemáticas sobre outras vitaminas que não a vitamina D e/ou abordassem esta vitamina noutros contextos que não os estabelecidos pelos objetivos propostos (ex.: avaliação laboratorial dos níveis de vitamina D nos alimentos, águas, ...).

II – Desenvolvimento

1.História e descoberta da vitamina D

A história da vitamina D remonta há cerca de 100 anos, e desenvolveu-se muito em paralelo com a elucidação acerca da patogenia do raquitismo (Silva, 2007). A vitamina D passou a assumir um papel de relevância, quando foi identificada como um agente fundamental para a cura do raquitismo, doença conhecida desde o século XVII, que se caracteriza pela presença de perturbações no metabolismo do cálcio e do fósforo, mais precisamente ao nível dos ossos e dentes (Silva, 2007).

O papel da vitamina D ao nível da sua ação no raquitismo começou a ser ponderado a partir de 1920, altura em que se conjecturava que na base desta doença poderia estar em causa uma carência de vitamina D na alimentação (Silva, 2007; Carpenter & Zhao, 1999). Em 1921, foi identificada pela primeira vez a relação direta existente entre a nutrição e o raquitismo, bem como a ação benéfica do óleo de fígado de bacalhau (rico em vitamina D) na sua prevenção (Pereira & Almeida, 2008; Silva, 2007; Fereira, 2005). Posteriormente, em 1922, McCollum e os seus colaboradores desenvolveram estudos, tendo por base o óleo de fígado de bacalhau, em que conseguiram identificar a presença de dois fatores, um fator A, designado posteriormente de vitamina A e de um outro fator, mais tarde denominado de vitamina D (Silva, 2007). Na mesma altura, a vitamina D foi identificada como um composto presente na fração insaponificável do óleo de fígado de bacalhau e foi sugerido que esta vitamina apresentava uma estrutura semelhante ao colesterol (Pereira & Almeida, 2008; Silva, 2007). Devido às suas propriedades terapêuticas, esta vitamina viria a ser conhecida como vitamina antirraquítica e, em 1925 foi, finalmente, identificada como vitamina D. Neste contexto, em 1928 através da apresentação e identificação da estrutura da vitamina D e da ligação com o tratamento de doenças, em particular com o raquitismo, o grupo de trabalho conduzido por Adolf Windaus foi galardoado com o prémio Nobel da Química.

Na sequência da caracterização química da vitamina D efetuada pelo grupo de Adolf Windaus, em 1936, foram identificadas duas formas de vitamina D que possuem ação antirraquitismo equivalente e se apresentavam como as de maior relevância de entre as dez formas de vitamina D conhecidas (Silva, 2007; DeLuca, 2004). Uma dessas formas é de origem exógena e derivada do ergosterol, designada de ergocalciferol ou vitamina

D₂, e outra é sintetizada pela pele, por irradiação solar, a partir do 7-deidrocolesterol, sendo esta forma designada de coilecalciferol ou vitamina D₃ (Fereira, 2005; Silva, 2007; Wolf, 2004).

Com o decorrer dos estudos sobre o raquitismo e sobre a vitamina D, verificou-se que este composto estava erradamente classificado como vitamina, uma vez que ao contrário das vitaminas conhecidas que eram substâncias essenciais obtidos por via exógena (através da alimentação), a vitamina D poderia ser obtida pelo próprio organismo através de um composto intermediário da biossíntese do colesterol, ou por exposição da pele à luz solar (Silva, 2007; Rosenfeld, 1997). De acordo com estudos realizados desde a segunda metade do século XX, o coilecalciferol é classificado como uma pró-hormona esteroide e não uma vitamina como se estabeleceu inicialmente, no entanto, continua a ser designada desta forma (Silva, 2007; DeLuca & Schnoes, 1983).

2.Caracterização físico-química da vitamina D e seus derivados

Apesar da existência de diferentes formas nutricionais de vitamina D, , apenas duas relevam interesse prático e científico:

- Colecalciferol ou vitamina D₃ (C₂₂H₄₄O): é de origem animal, e apresenta-se como a forma de vitamina D de maior importância quer ao nível do desempenho de funções biológicas quer de nutrição;
- Ergocalciferol ou vitamina D₂ (C₂₈H₄₄O): é de origem vegetal, sendo a forma mais utilizada ao nível da terapêutica (Silva, 2007; Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013).

A vitamina D₂ e D₃ são classificadas quimicamente como secoesteroides, ou seja, um dos quatro anéis que as constituem apresenta-se quebrado, neste caso concreto ocorre a quebra de um anel com adição de dois átomos de hidrogénio em cada grupo terminal (Pereira & Almeida, 2008; Barral *et al.*, 2007). Em termos estruturais a vitamina D₂ e D₃ (Figura 1) são semelhantes, sendo a principal diferença química ao nível da cadeia lateral, mais precisamente no carbono 17, onde a vitamina D₂ apresenta uma ligação dupla adicional e um grupo metil incorporados na cadeia lateral (Ball, 1988; Barral *et al.*, 2007; Javorsky *et al.*, 2006).

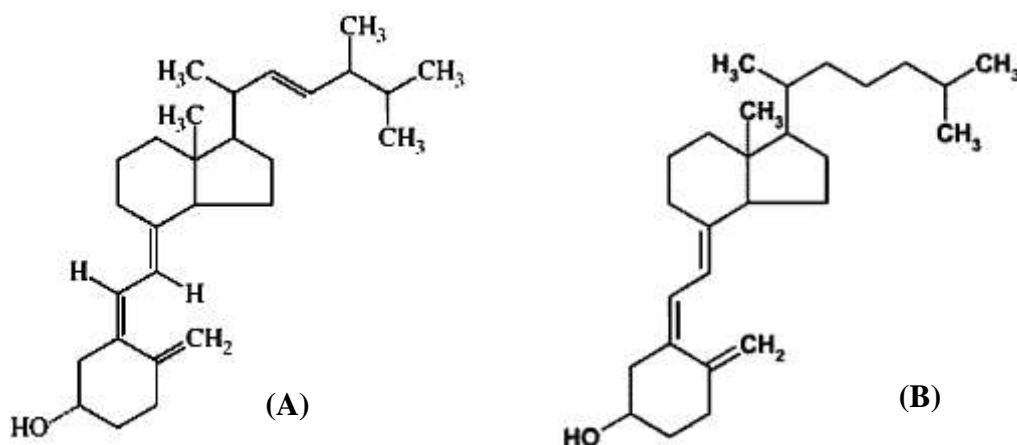


Figura 1 – Estrutura química da (A) vitamina D₂ (ergocalciferol) e da (B) vitamina D₃ (colecalciferol) (retirado de Barral *et al.*, 2007).

Quando puras estas vitaminas apresentam-se sob a forma de cristais de coloração branca-amarelada de pequenas dimensões e sem odor (Ferreira, 2005; Ball, 1988). Em termos de solubilidade, são compostos lipossolúveis, insolúveis em água, solúveis em etanol a 95%, acetona, benzeno, clorofórmio e éter (Ball, 1988; Ferreira, 2005). Para além destas características, estas formas biológicas da vitamina D são resistentes à temperatura (sendo a vitamina D₃ a mais estável), apresentam elevada resistência aos processos de oxidação e são instáveis em soluções ácidas ou sob condições moderadamente ácidas, que provocam processos de isomerização (Ball, 1988; Grady & Thakker, 1980; McDowell, 1989).

3.Fontes de obtenção de Vitamina D

A vitamina D é obtida através de três tipos de fontes: a partir da exposição solar, da dieta e da suplementação. A exposição solar assume-se como a principal fonte de obtenção de vitamina D (80-90%) (Fraser & Milan, 2013; Ostermeyer *et al.*, 2006; Lichtenstein *et al.*, 2013). Por outro lado a vitamina D obtida através da dieta representa apenas uma pequena parte das quantidades necessárias para satisfazer as necessidades do Ser Humano (Lichtenstein *et al.*, 2013; Holick, 2007; Alves *et al.*, 2013).

Como referenciado anteriormente, a exposição solar funciona como a principal forma de obtenção de vitamina D e seus derivados. A pele é capaz de produzir após

exposição às radiações solares, mais precisamente às radiações ultravioletas do tipo B (UVB), cujos comprimentos de onda se situam na faixa de 290-315 nm, vitamina D sob a forma de vitamina D₃ (Lichtenstein *et al.*, 2013; Gilchrest, 2008; Jakobsen & Saxholt, 2009). Devido a este facto, a vitamina D é vulgarmente designada por vitamina do Sol (Lichtenstein *et al.*, 2013).

Apesar da situação anteriormente referenciada, atualmente existe alguma controvérsia sobre a exposição prolongada da pele aos raios UVB, uma vez que esta situação favorece um envelhecimento precoce da pele, e pode originar situações mais graves, nomeadamente cancro (Wolpowitz *et al.*; 2006, Reichrath, 2009; Gilchrest, 2008). De forma a evitar os casos que podem estar associadas à exposição solar excessiva, é comum o uso de protetores solares que, contudo, podem limitar a síntese de vitamina D (Lichtenstein *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013; Rosen, 2011). Alguns estudos que descrevem que o uso de protetores solares de fator 30 diminui a síntese de vitamina D em mais de 95% (Lichtenstein *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013; Rosen, 2011). Para compensar esta situação, recomenda-se uma exposição solar relativamente frequente (2 ou 3 vezes por semana) sem recurso a filtro solar durante um curto intervalo de tempo (10 a 15 minutos) (Lichtenstein *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013; Rosen, 2011). Deve ainda ter-se em conta a cor da pele, dado que é um fator que influencia a produção de vitamina D. Assim, indivíduos com pele mais escura necessitam de uma exposição mais prolongada (3-5 vezes maior) para produzirem a mesma quantidade de vitamina D que um indivíduo de pele clara (Lichtenstein *et al.*, 2013; Rosen, 2011).

Para além dos fatores anteriores, há outros que condicionam a síntese da vitamina D na pele, designadamente a latitude, a estação do ano, o vestuário, o estilo de vida, a poluição e as condições meteorológicas (Lichtenstein *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013; Jakobsen & Saxholt, 2009). Quanto à latitude, existem estudos, que revelaram que em latitudes nórdicas, os níveis de vitamina D reduzem cerca de 20% desde o final do verão até meados do inverno. No entanto, 30 minutos de exposição solar durante o período do verão originam uma quantidade de vitamina D suficiente (Holick, 2007; Alves *et al.*, 2013; Gilchrest, 2008). Os níveis de vitamina D variam ainda devido a fatores hormonais, genéticos e nutricionais (Lichtenstein *et al.*, 2013; Holick, 2007; Rosen, 2011). Um exemplo são os obesos que apresentam valores séricos de vitamina D menores, revelando uma relação indireta entre o Índice de Massa Corporal (IMC) e os valores séricos de

vitamina D. Esta situação pode ser parcialmente justificada pela reduzida prática de atividade física e exposição solar (Holick, 2007; Rosen, 2011).

A partir da dieta também se pode obter vitamina D. No entanto, as quantidades obtidas não conseguem suprimir as necessidades diárias do indivíduo. A maioria dos produtos naturais que possuem vitamina D constituem uma fonte pobre desta substância, contribuindo com menos de 10% para a DDR de vitamina D (Holick, 2007).

Como fontes naturais mais ricas em vitamina D₃ destacam-se os óleos de fígado de peixe sendo o de bacalhau e de atum aqueles que possuem um maior conteúdo neste composto (Lichtenstein *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013). Estes óleos, para além de possuírem um conteúdo relativamente significativo em vitamina D, possuem também um conteúdo relevante em vitamina A (Alves *et al.*, 2013; Jenab *et al.*, 2010). Para além destes alimentos, podem ser também encontradas quantidades satisfatórias de vitamina D₃ em partes comestíveis de peixes que apresentam valores elevados de gordura (sardinha, cavala, atum,...), fígado de mamíferos, ovos e produtos lácteos (Pereira & Almeida, 2008; Lichtenstein *et al.*, 2013). No caso dos produtos lácteos, e em particular do leite, este apresentam uma variação sazonal em vitamina D. Pensa-se que esta situação possa estar relacionada com a quantidade de luz solar que atinge a pele do animal, e que, permite que seja realizada a conversão da 7-dehidrocolesterol da pele do animal em colecalciferol.

No caso da vitamina D₂, as maiores fontes desta forma de vitamina D são os cogumelos que podem apresentar um teor entre 30 a 100 µg de vitamina D₂ por 100 g de produto (Alves *et al.*, 2013; Jenab *et al.*, 2010).

Na Tabela I encontram-se registados exemplos de fontes naturais e respetiva proporção em vitamina D (D₂ e D₃), expressa em UI (unidade internacional).

Tabela I – Proporções de vitamina D (D₂ e D₃) presentes nas várias fontes (adaptado de Pereira & Almeida, 2008 e Lichtenstein *et al.*, 2013).

Fonte de Vitamina D	Forma de Vitamina D	Unidades Internacionais (UI)
Óleo de fígado de bacalhau (uma colher)	D ₃	400-1360 UI
Cogumelos <i>shitake</i> frescos	D ₂	100UI/100 mL
Cogumelos <i>shitake</i> secos	D ₂	1600 UI/100 mL
Salmão fresco selvagem	D ₃	600-1000 UI /100 mL
Salmão fresco criado em cativeiro	D ₃ , D ₂	100 -250 UI/ 100mL
Salmão enlatado	D ₃	300-600 UI/ 100 mL
Sardinha, Cavala e Atum em lata	D ₃	236-300 UI/100 mL
Produtos lácteos e cereais fortificados	D ₂	40-100 UI
Gema de ovo	D ₃ , D ₂	20 UI/ unidade
Exposição solar corporal a UV-B (15-20 min ao meio-dia Verão, indivíduo de pele clara)	D ₃ , D ₂	10 000 UI

Atualmente há uma preocupação crescente com a ingestão de vitamina D, dado o reconhecimento de que a sua síntese através da exposição solar pode não ser suficiente para satisfazer as necessidades do organismo. Estas quantidades insuficientes de produção de vitamina D a partir da exposição solar, devem-se a diferentes fatores já enumerados (tipo de vestuário, cor da pele, latitude, entre outros). Desta forma, pode ser necessário recorrer a fontes alimentares ou a outro tipo de fontes para satisfazer as necessidades de vitamina D (Calvo *et al.*, 2004). No entanto, tal como já foi referido anteriormente, as fontes alimentares disponíveis possuem uma pequena quantidade de vitamina D. Por esta razão, em diversas situações, há necessidade de administração de suplementos de vitamina D ou a suplementação de alguns produtos mais consumidos com o objetivo do consumidor ingerir a dose diária recomendada (Calvo *et al.*, 2004; Baynes & Dominiczak, 2011).

Ao contrário do que acontece quando se recorre ao uso de muitos suplementos, quando se utiliza a suplementação de produtos alimentares com vitamina D, o objetivo é corrigir uma deficiência ambiental existente, nomeadamente, a menor exposição à radiação ultravioleta, e não de corrigir a sua falta devido a razões nutricionais (Vieth,

1999; Calvo *et al.*, 2004). Produtos alimentares suplementados com vitamina D, nomeadamente, produtos lácteos (leite e iogurtes), cereais e pão existem disponíveis em várias zonas geográficas, nomeadamente nos Estados Unidos e no norte da Europa, fazendo estes produtos parte das políticas de prevenção de saúde destas regiões (Vieth, 1999; Calvo *et al.*, 2004; Holden & Lemar, 2008).

4. Metabolismo da vitamina D

A vitamina D pode apresentar-se sob a forma de vitamina D₂ (ergocalciferol) existente naturalmente em plantas e fungos e vitamina D₃ (colecalciferol) existente em animais, sendo ambas denominadas vitamina D (Figura 2).

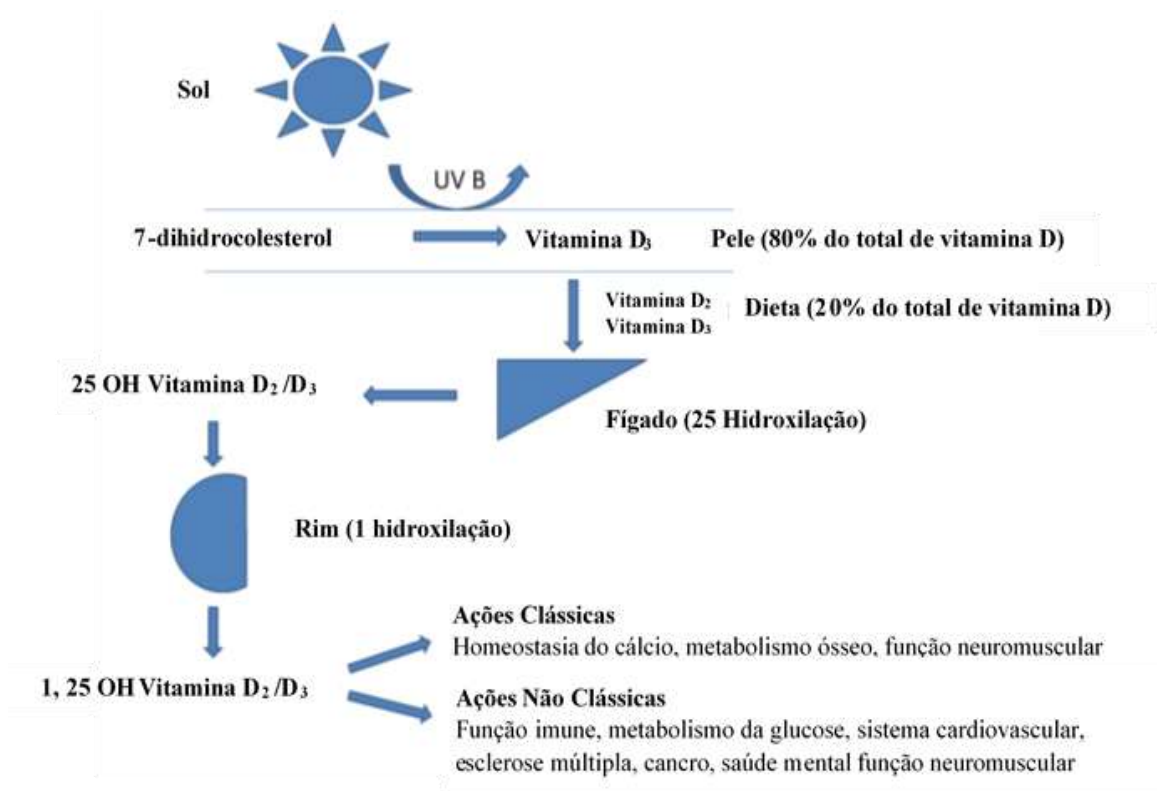


Figura 2 - Produção de vitamina D (retirado de Fraser & Milan, 2013)

A vitamina D₂ é obtida da irradiação ultravioleta sobre o ergosterol, esteroide existente na membrana de fungos e invertebrados, sendo encontrada naturalmente em leveduras e cogumelos expostos à luz solar (Alves *et al.*, 2013; Dixon & Mason, 2009). Por outro lado, a síntese de vitamina D₃ é realizada pela ação dos raios UV no substrato

7-deidrocolesterol presente na pele dos animais (Wimalawansa, 2012; Alves *et al.*, 2013; Dixon & Mason, 2009).

O 7-deidrocolesterol ou pró-vitamina D₃ é produzido quer na epiderme quer na derme, sendo a partir desta que forma a pré-vitamina D₃ (Lichtenstein *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013; Premaor & Furlanetto, 2006). Por exposição aos raios UVB, o 7-deidrocolesterol presente na derme e epiderme é convertido em pré-vitamina D₃, através de uma reação fotolítica, não enzimática (Wimalawansa, 2012; Holick, 2004; Santos, 2011). Uma vez formada a pré-vitamina D₃ sofre uma outra reação não enzimática, mais precisamente uma isomerização térmica, que leva à formação da vitamina D₃ (Wimalawansa, 2012; Holick, 2004; Santos, 2011).

A vitamina D proveniente da pele ou da dieta é biologicamente inerte, precisando de sofrer uma série de transformações para se tornar ativa (Pereira & Almeida, 2008; Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013). Assim, a vitamina D (obtida a partir da isomerização da pré-vitamina D₃ na camada basal da epiderme ou pela absorção intestinal de alimentos enriquecidos e suplementos), liga-se à proteína ligadora de vitamina D (DBP) na corrente sanguínea e é transportada para o fígado onde é hidroxilada por enzimas do citocromo P450 (CYP450), mais precisamente pelas 25-hidroxilases (25-OHase) hepáticas mitocondriais e microsossomais, que são codificadas pelo gene CYP27A1, dando origem a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) com um tempo de meia-vida de 21 a 30 dias (Fraser & Milan, 2013). Grande parte do 25(OH)D produzido é depositada ao nível do tecido adiposo, o qual representa o seu principal reservatório (Pereira & Almeida, 2008; Lichtenstein *et al.*, 2013). A produção de 25(OH)D no fígado é rápida, sofrendo pouco regulação (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013; Holick, 2004). Devido a esta situação, esta é forma de vitamina D circulante predominante e os seus níveis séricos refletem os níveis de reserva corporal de vitamina D (Wimalawansa, 2012; Alves *et al.*, 2013). Desta forma, o seu doseamento é o mais indicado na avaliação do *status* corporal de vitamina D, uma vez que se relaciona não só com a síntese cutânea mais também com a ingestão (Wimalawansa, 2012; Alves *et al.*, 2013).

No entanto, o metabolito 25(OH)D não apresenta a atividade biológica necessária para realizar as funções biológicas características da vitamina D necessitando de ser alvo de uma nova hidroxilação para formar a 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D) que é a

forma mais ativa da vitamina D (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013; Holick, 2004). Esta hidroxilação processa-se ao nível do rim, mais precisamente nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais do rim (Pereira & Almeida, 2008; Wimalawansa, 2012; Holick, 2004). Nesta porção do rim estão presentes as 1α -hidroxilases (1α -OHase) codificadas pelo gene CYP27B1, através das quais a $25(\text{OH})\text{D}$ é convertida em $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ou calcitriol (Pereira & Almeida, 2008; Wimalawansa, 2012; Holick, 2004, Wolpowitz & Gilchrest, 2006).

Apesar de ser a forma biologicamente ativa da vitamina D a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, circula em concentrações cerca de 1000 vezes menores às da $25(\text{OH})\text{D}$ (concentrações na ordem dos picomolares enquanto o $25(\text{OH})\text{D}$ circula na ordem dos nanomolares). No entanto apresenta uma afinidade maior para o recetor da vitamina D (VDR) e é biologicamente mais potente (Pereira & Almeida, 2008; Wimalawansa, 2012; Premaor & Furlanetto, 2006). A produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é estimulada, pela hormona paratiroideia (PTH) que estimula a atividade da enzima 1α -OHase dos rins. Esta enzima é também controlada pela concentração de cálcio e fósforo e pela concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013). Assim, quando o nível de cálcio e fósforo no sangue é muito baixo os gânglios paratiroides segregam PTH que por sua vez aumenta a produção da forma ativa da vitamina D que atua depois estimulando a absorção de cálcio e fósforo ao nível do intestino delgado, intervindo na mobilização de cálcio e fósforo nos ossos e aumentando a reabsorção do cálcio nos rins. No caso da PTH, esta tende a aumentar os seus valores quando os níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ se encontram reduzidos, consequentemente ocorre um aumento de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013, Premaor & Furlanetto, 2006). Por outro lado, quando se verificam níveis elevados de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ocorre um *feedback* negativo sobre a PTH (Wimalawansa, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2013, Premaor & Furlanetto, 2006).

O reconhecimento da atividade da 1α -hidroxilase em vários outros tecidos (promovendo a hidroxilação ao nível extra-renal da $25(\text{OH})\text{D}$) representou um grande avanço na compreensão das atividades biológicas que têm sido associadas à vitamina D. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ extra-renal atua de forma autócrina e parácrina, com funções celulares específicas tais como a inibição da proliferação celular, indução da diferenciação celular, regulação imune, a inibição da angiogénese, a estimulação da produção de insulina, a inibição da produção de renina e a estimulação da produção de catelicidina dos macrófagos (Pereira & Almeida, 2008; Dusso *et al.*, 2005; Leventis & Patel., 2008).

Assim como as ações biológicas potenciada pelas $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzida por hidroxilação renal e extra-renal são diferentes, a regulação da atividade renal ou extra-renal da $25(\text{OH})\text{D}$ -1- α -hidroxilase é diferente (Figura 3).

A hidroxilação renal é regulada pelos níveis de ingestão de cálcio e fósforo, níveis circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e PTH. Os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ são por isso relativamente constantes e independentes da concentração de $25(\text{OH})\text{D}$. Em contraste, a atividade da $25(\text{OH})\text{D}$ -1- α -hidroxilase extra-renal é determinada por fatores locais como citocinas e fatores de crescimento que otimizam os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ para funções celulares específicas (Dusso *et al.*, 2005; Leventis & Patel., 2008; Pereira & Almeida, 2008). Adicionalmente, a hidroxilação extra-renal depende muito dos níveis de $25(\text{OH})\text{D}$. Assim, a deficiência em vitamina D ocasiona um déficit de substrato de $25(\text{OH})\text{D}$ com particular influencia na atividade da enzima $25(\text{OH})\text{D}$ -1- α -hidroxilase extra-renal, levando a uma consequente redução das ações da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Wimalawansa, 2012; Dusso *et al.*, 2005; Leventis & Patel., 2008). Desta forma, coloca-se a hipótese de que a deficiência crônica de vitamina D leva a baixos níveis circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e ao aumento do risco de doenças ósseas e não ósseas (Wimalawansa, 2012; Pereira & Almeida, 2008). A maioria das ações biológicas do $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ são mediadas através recetores de vitamina D localizados a nível nuclear e membranar, com efeitos genómicos e não genómicos (Lemos *et al.*, 2007; Wimalawansa, 2012).

Para além das ações anteriormente referenciadas, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estimula a sua própria inativação através do aumento da expressão da enzima 24-hidroxilase (24-OHase), isoenzima do citocromo P450 (codificada pelo gene *CYP24A1*), que metaboliza a $25(\text{OH})\text{D}$ e a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ em formas hidrossolúveis inativas, que são consequentemente excretados (Alves *et al.*, 2013; Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012).

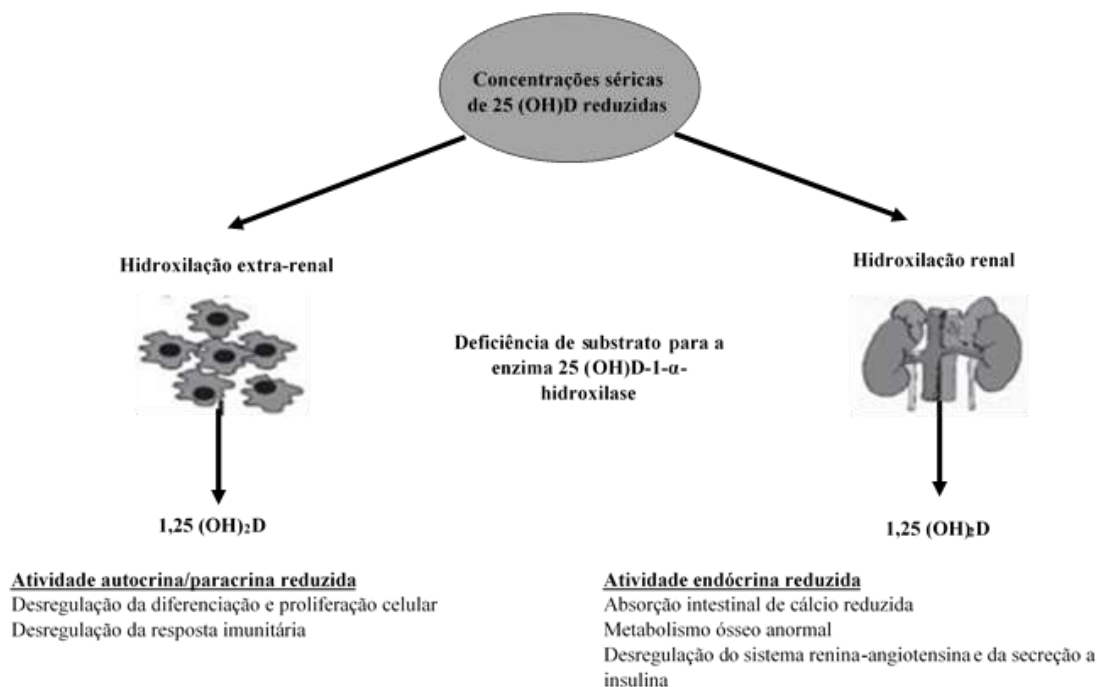


Figura 3 - Hidroxilação renal e extra-renal de 25(OH)D (adaptado de Leventis & Patel., 2008).

5. Funções da vitamina D

As suas ações fisiológicas ao nível do metabolismo ósseo, função clássica da vitamina D, são extensamente conhecidas. É uma das hormonas com papel fundamental na manutenção dos níveis de cálcio sérico, exercendo essa ação através da promoção da absorção de cálcio e fósforo a partir do intestino e da reabsorção óssea de cálcio (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012). No entanto, estudos mais recentes indicam que o seu papel fisiológico não se restringe ao metabolismo ósseo, estando associado a outras situações clínicas, como por exemplo diabetes, doenças cardiovasculares, cancro, distúrbios psiquiátricos e doenças neuro-musculares (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012).

Ao nível do metabolismo ósseo, a sua principal influência prende-se com a ação hipercalcemiante associada ao 1,25(OH)₂D, permitindo que esta atue ao nível da regulação dos níveis séricos de cálcio e fósforo (Figura 4) (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015).

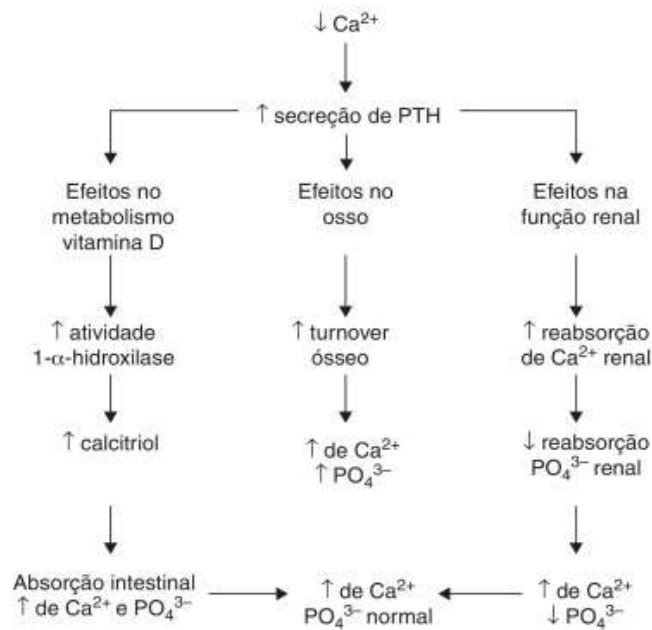


Figura 4 - Mecanismos envolvidos na regulação dos níveis séricos de cálcio e fósforo (retirado de Urrutia-Pereira & Solé, 2015).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é uma hormona que atua em três níveis: intestinal, ósseo e renal. Ao nível intestinal este metabolito promove a absorção do cálcio proveniente da alimentação e secundariamente dos fosfatos (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ atua ao nível intestinal em dois locais primordiais: a bordadura em escova das células intestinais e nas células intestinais propriamente ditas (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015). Na bordadura em escova conduz a um aumento na síntese do transportador de cálcio, destacando-se este mecanismo de ação como o principal na absorção do cálcio ao nível intestinal (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015). Por outro lado, ao nível das células intestinais, promove o aumento da síntese de uma proteína (calbindina) que promove o transporte do cálcio entre as células intestinais e o plasma contra um gradiente de concentração, facilitando também a difusão passiva de íons fosfato (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015).

A nível ósseo, quando ocorre hipocalcemia, a vitamina D ativa a reabsorção óssea de forma direta, promovendo a ocorrência da diferenciação e ativação das células mesenquimatosas e dos osteoclastos (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015).

Em termos renais, a vitamina D promove um aumento da reabsorção do cálcio a nível tubular através de uma ação direta sobre o canal epitelial cálcico (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015). No que concerne aos fosfatos, também se verifica uma diminuição da sua reabsorção a nível tubular, mas esta é uma consequência secundária advinda da inibição da secreção da PTH ocorrida devido a presença de hipercalcemia resultante da administração de vitamina D (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015)

Como referenciado anteriormente, paralelamente a esta ação ao nível do metabolismo ósseo, a vitamina D desempenha um papel importante ao nível de outras funções biológicas (Figura 5), como por exemplo uma ação imunomoduladora (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2012; Urrutia-Pereira & Solé, 2015).

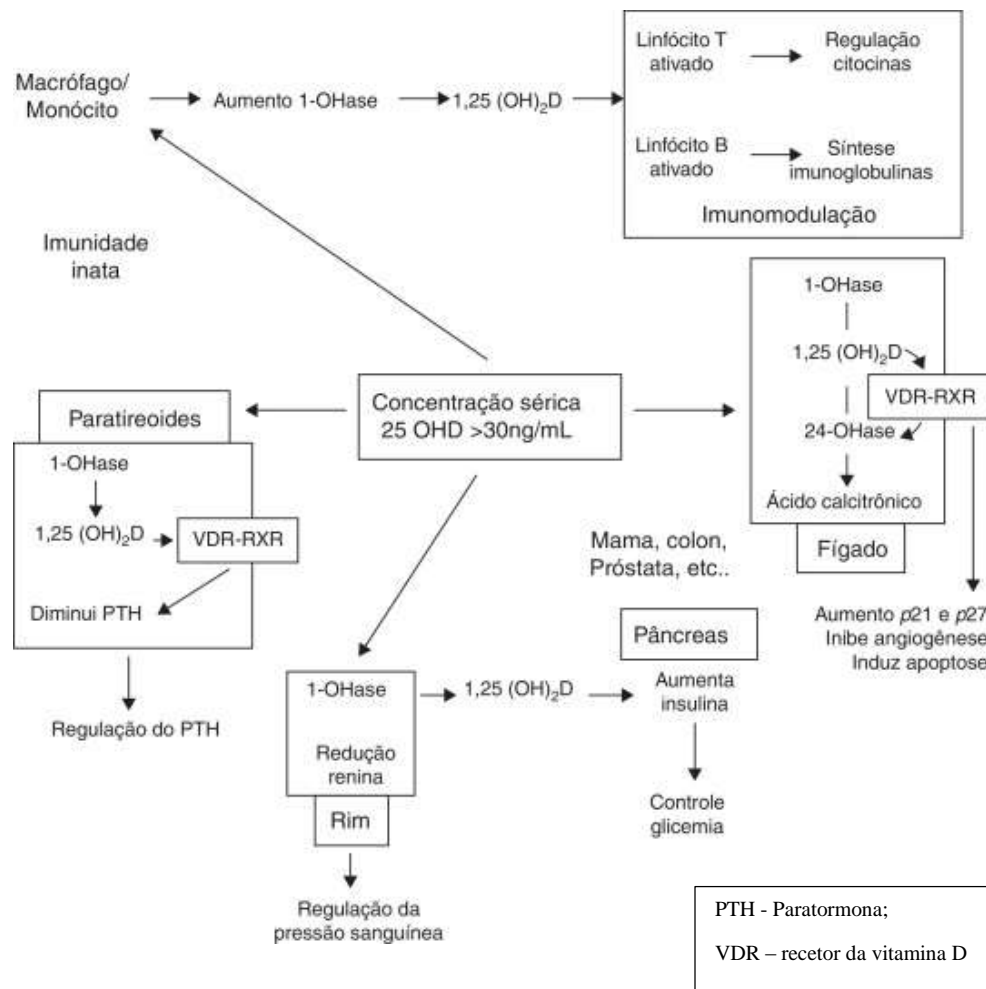


Figura 5 – Funções não-esqueléticas da vitamina D. PTH - Paratormona; VDR – recetor da vitamina D (retirado de Urrutia-Pereira & Solé, 2015).

Quando um macrófago ou monócito é alvo de estimulação por um agente infeccioso através do seu recetor *toll-like* (TLR2/1), o sinal gerado regula de forma positiva o VDR e a 25(OH)D 1 α -hidroxilase (1-OHase) (Holick, 2007). Se se verificam níveis séricos de 25(OH)D na ordem dos 30 ng/mL ou superiores, esta fornece um substrato suficiente para a atuação da 1-OHase, permitindo a conversão 25 (OH)D em 1,25(OH)₂D (Holick, 2007). Esta forma ativa da vitamina D quando presente no núcleo conduz a um aumento da expressão de catelicidina, um péptido que é capaz de promover a imunidade inata e induzir a destruição de agentes infecciosos (Holick, 2007). Para além desta ação, a 1,25(OH)₂D produzida pelos monócitos ou macrófagos pode atuar a nível local, mais precisamente ao nível de linfócitos T ativados ou linfócitos B onde regula síntese de citocinas e de imunoglobulinas, respetivamente (Holick, 2007).

Além desta ação imunomoduladora, concentrações de 25(OH)D próximas ou iguais a 30 ng/mL promovem uma redução no risco de desenvolvimento de algumas neoplasias comuns (Holick, 2007). Neste sentido, verifica-se que a produção local de 1,25(OH)₂D ao nível da mama, colon, próstata e de outros tecidos, permitem uma regulação de genes que controlam a proliferação, inibem a angiogénese, induzem a diferenciação e apoptose (Holick, 2007). Quando a 1,25(OH)₂D termina a sua tarefa de manutenção e diferenciação celular normal, vai promover a expressão da enzima 24-OHase, aumentando consequentemente o catabolismo da 1,25(OH)₂D a ácido calcitróico (composto biologicamente inativo) (Holick, 2007). Desta ação, verifica-se que a 1,25(OH)₂D produzida localmente não apresenta nenhuma intervenção ao nível do metabolismo do cálcio, nem entra em circulação (Holick, 2007).

A vitamina D pode ainda desenvolver ações ao nível das glândulas paratireoides, do rim e do pâncreas. Nas glândulas paratireoides, a capacidade de produção local de 1,25(OH)₂D, conduz à inibição da expressão e da síntese de PTH (Holick, 2007). No rim, a 1,25 (OH)₂D produzida entra em circulação, regulando negativamente a produção de renina, permitindo consequentemente o controlo da pressão arterial (Holick, 2007). Por outro lado, ao nível do pâncreas a 1,25 (OH)₂D conduz à estimulação da secreção de insulina pelas células beta dos ilhéus pancreáticos, permitindo um controlo da glicemia (Holick, 2007).

6. Relação entre a Vitamina D e determinadas patologias/situações clínicas

Na sequência da descrição dos processos fisiológicos em que a vitamina D está envolvida, referenciados no tópico anterior, vários estudos têm descrito associações entre diversas patologias/situações clínicas e a presença de alterações nos níveis séricos de vitamina D. Em seguida descrevem-se algumas destas associações, quer com patologias quer com determinadas situações clínicas (ex.: fraturas e quedas).

6.1. Vitamina D e Cancro

A associação entre a vitamina D e o cancro tem sido extensamente estudada. Em níveis adequados esta vitamina exerce efeitos reguladores sobre a proliferação, diferenciação e apoptose das células tumorais, promovendo diferenciação celular, inibição da proliferação vascular e de células cancerígenas e, ainda, exibe propriedades anti-inflamatórias e proapoptóticas (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pereira & Almeida, 2008, 2008; Manson *et al.*, 2011). Estas ações permitem uma potenciação de alguns fármacos quimioterápicos, sugerindo desta forma uma importante ação anticancerígena da vitamina D (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pereira & Almeida, 2008; Manson *et al.*, 2011).

Apesar deste efeito benéfico da vitamina D, quando se existem níveis séricos de vitamina D reduzidos, pode verificar-se o efeito contrário, ou seja, pode conduzir ao aparecimento de cancro.

De facto, alguns estudos verificaram correlações positivas entre níveis séricos de 25(OH)D baixos e uma maior incidência e mortalidade por cancro. Garland *et al.* (2007) realizaram um estudo em que foram analisados 880 casos de cancro da mama e 880 casos controlo (Alves *et al.*, 2013; Garland *et al.*, 2007). Constatou que a ingestão de 2000 UI/dia de vitamina D₃, e, quando possível, a exposição à luz solar, mas muito moderada, poderia aumentar os níveis de 25(OH)D no soro para 52 ng/mL (Alves *et al.*, 2013; Garland *et al.*, 2007). Este resultado demonstrou que mulheres com níveis séricos de 25(OH)D de cerca de 52 ng/mL apresentavam um risco 50% menor de desenvolver cancro da mama em comparação com mulheres com níveis < 13 ng/mL (Holick, 2007; Garland *et al.*, 2007). Um outro estudo realizado em mulheres em pós menopausa com cancro da mama, constatou a existência de uma associação inversa entre os níveis séricos de 25(OH)D e o risco de desenvolvimento de cancro da mama, especialmente se os níveis apresentados fossem < 20 ng/mL (Holick, 2007; Abbas *et al.*, 2008).

De forma semelhante aos estudos anteriores, Park *et al* (2015) realizaram um estudo em mulheres coreanas no sentido de verificar o papel da vitamina D no desenvolvimento de cancro da mama, mais precisamente, a existência de um risco aumentado de desenvolvimento de cancro da mama quando existiam níveis séricos de 25(OH)D diminuídos (Park *et al.*, 2015). O estudo revelou um papel preventivo da vitamina D no desenvolvimento de cancro da mama, ou seja, níveis adequados de vitamina D diminuía a incidência de cancro da mama (Park *et al.*, 2015).

Uma série de outros estudos e meta-análises têm, na sua generalidade, revelado um potencial preventivo da vitamina D no desenvolvimento do cancro de mama, revelando uma associação inversa entre os níveis de 25(OH)D e o risco de desenvolvimento de cancro de mama (Abbas & Linseisen, 2009; Crew *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2010; Kawase *et al.*, 2010; Kim & Je, 2014; Lin *et al.*, 2007; Lowe *et al.*, 2005; Rejnmark *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010).

A associação dos níveis séricos de vitamina D e o risco de desenvolvimento de outros tipos de cancro tem, também, sido avaliada. Lee *et al* (2011) desenvolveram uma metanálise, onde foram incluídos 8 estudos prospetivos, com um total de 1822 doentes com cancro do cólon e 868 doentes com cancro retal. Verificaram existir uma associação inversa entre os níveis séricos de 25(OH)D e a ocorrência de cancro colorretal, tendo constatado que esta associação era mais evidente no caso de cancro retal (Lee *et al.*, 2011).

Chung *et al* (2011) realizaram também uma meta-análise onde pretendiam avaliar os benefícios da vitamina D ou suplementação com cálcio na prevenção de cancro e fraturas (Chung *et al.*, 2011). No caso concreto do cancro, este estudo verificou um aumento da mortalidade em homens que apresentassem níveis mais baixos de 25 (OH)D (Chung *et al.*, 2011; Lichtenstein *et al.*, 2013). Por outro lado, constatou que a incidência de cancro colorretal diminuía em 6% a cada aumento da concentração sérica de 25(OH)D de 5 ng/ml (Chung *et al.*, 2011; Lichtenstein *et al.*, 2013). Ao nível da suplementação com vitamina D, este estudo verificou uma redução da incidência e da mortalidade por cancro, se efetuada uma suplementação com 1100 UI de vitamina D/dia + cálcio (Chung *et al.*, 2011; Lichtenstein *et al.*, 2013).

Helzlsouer *et al.* (2010) desenvolveram um estudo onde pretendiam, também, verificar possíveis correlações entre os níveis séricos de vitamina D e a incidência/mortalidade por cancro (Helzlsouer *et al.*, 2010; Lichtenstein *et al.*, 2013). Este estudo trabalho não identificou qualquer tipo de associação entre o nível sérico de vitamina D e o desenvolvimento de cancro, nomeadamente, cancro da próstata, mama, endométrio, esófago, estômago, rins, linfoma não Hodgkin e ovário (Helzlsouer *et al.*, 2010; Lichtenstein *et al.*, 2013). Por outro lado, ao nível do cancro do pâncreas, verificou haver um risco aumentado quando se verificavam níveis séricos de 25(OH)D acima de 5 ng/mL (Helzlsouer *et al.*, 2010; Lichtenstein *et al.*, 2013).

Para além da correlação entre os níveis séricos de vitamina D e a ocorrência de cancro, diversos estudos avaliaram ainda o papel da suplementação com vitamina D na prevenção do desenvolvimento de cancro. Um estudo realizado durante 4 anos em que foram avaliadas 1085 mulheres saudáveis que se encontravam a ingerir suplementos de placebo, cálcio ou cálcio + vitamina D, verificou que a suplementação com vitamina D reduzia em 77% o risco de desenvolvimento de cancro (Alves *et al.*, 2013; Lappe *et al.*, 2007). Um outro estudo realizado por Chung *et al.* (2011), efetuado em indivíduos com suplementação de vitamina D, determinou haver uma redução da incidência e da mortalidade por cancro, se efetuada uma suplementação com 1100 UI de vitamina D/dia + cálcio (Chung *et al.*, 2011; Lichtenstein *et al.*, 2013).

Um trabalho conduzido por Manson *et al.* (2011) constatou não existir relação causa-efeito entre a suplementação com 400 UI de vitamina D/dia + cálcio e a incidência ou mortalidade por cancro em geral e em particular por cancro colorretal e mama (Lichtenstein *et al.*, 2013; Manson *et al.*, 2011). Além disso, também não verificou uma correlação entre uma administração a cada 4 meses de 100 000 UI de vitamina D + cálcio e a incidência ou mortalidade por cancro em geral e em particular no cancro colorretal e mama (Lichtenstein *et al.*, 2013; Manson *et al.*, 2011).

A análise destes e de outros estudos verificou existir alguma controvérsia, uma vez que não existe uma concordância significativa que permita afirmar que os níveis séricos de vitamina D são agentes potenciadores ou protetores no desenvolvimento de cancro (Lichtenstein *et al.*, 2013). Adicionalmente, estes estudos podem ser alvo de alguns enviesamentos, dado que parâmetros como o facto de pacientes com cancro terem à partida uma menor tendência a expor-se ao sol, bem como a apresentarem desnutrição,

podem levar a que apresentarem menores níveis de vitamina D (Lichtenstein *et al.*, 2013). Outra situação a considerar, são a presença de alguns fatores que podem estar associados aos indivíduos em estudo e que podem influenciar os valores de vitamina D, nomeadamente a presença de obesidade (o tecido adiposo sequestra a vitamina D), o sedentarismo (implica uma menor exposição solar), pigmentação da pele (pigmentação negra tem uma menor produção de vitamina D mesmo com exposição solar adequada), tipo de alimentação (reduzido consumo de vitaminas) (Lichtenstein *et al.*, 2013).

Assim, ao nível da suplementação com vitamina D, considerando as evidências científicas não se pode afirmar que existe uma evidência suficiente para se considerar que baixos níveis de vitamina D podem contribuir para uma maior incidência/ mortalidade por cancro, e por si só justificar a suplementação como forma de prevenção (Lichtenstein *et al.*, 2013; Wactawski-Wende *et al.*, 2006).

Assim, embora os primeiros ensaios clínicos epidemiológicos sejam inconsistentes, e estudos controlo em humanos ainda não existam em número suficiente para apoiar conclusivamente o papel benéfico da vitamina D, os resultados de ensaios pré-clínicos e de alguns estudos clínicos sugerem fortemente que a deficiência de vitamina D aumenta o risco de desenvolver cancro (Feldman *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2015). Para além disso, referem e evidenciam que de forma a evitar a deficiência deste composto a adição de suplementos de vitamina D pode ser uma forma económica e segura de reduzir a incidência e melhorar o prognóstico de cancro (Feldman *et al.*, 2014).

6.2. Vitamina D e Doenças cardiovasculares

Ao nível das doenças cardiovasculares (DCV) têm sido desenvolvidos estudos que sugerem possíveis mecanismos de ação ou influência da vitamina D ao nível do sistema cardiovascular (Santos, 2011; Lichtenstein *et al.*, 2013). A sua presença da vitamina D em adequadas concentrações inibe a proliferação de cardiomioblastos, promovendo a paragem do ciclo celular, aumenta a formação de cardiomicrotúbulos, sem indução da apoptose (Lichtenstein *et al.*, 2013; Santos, 2011).

Ao longo dos tempos, vários estudos têm sido realizados, de modo a avaliar estas possíveis correlações positivas entre a vitamina D e ocorrência e/ou prevenção de doenças cardiovasculares. Wang *et al.* (2008) desenvolveram um estudo prospetivo com este objetivo, no qual acompanhou 1739 indivíduos com doença cardiovascular prévia durante

5 anos. Identificaram que indivíduos com hipertensão arterial (HTA) e níveis de 25(OH)D < 15 ng/mL apresentavam um risco 2 vezes superior de desenvolver eventos cardiovasculares, quando comparados com indivíduos que apresentavam níveis superiores a 15 ng/mL de 25(OH)D (Alves *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010). Num outro estudo, neste caso uma revisão sistemática realizada por Pittas *et al.* (2010), verificou que ocorria um aumento da incidência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) quando estavam presentes níveis de 25(OH)D mais baixos (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pittas *et al.*, 2010a). Paralelamente, a nível do risco relativo de incidência e mortalidade por DVC verificou que este variava entre 0,8 (quando os níveis de vitamina D eram de 30 ng/mL) e 2,2 (para valores de inferiores a 10 ng/mL) (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pittas *et al.*, 2010a).

Giovannucci *et al.* (2008) desenvolveu um estudo prospectivo semelhante aos anteriormente referenciados, no qual avaliaram o risco de desenvolvimento de enfarte agudo do miocárdio (EAM), tendo concluído que o risco de EAM duplicava nos indivíduos com níveis de 25(OH)D < 15 ng/mL, em comparação com os indivíduos que apresentavam níveis > 30 ng/mL (Giovannucci *et al.*, 2008; Lichtenstein *et al.*, 2013). Um outro estudo com 3258 indivíduos que tinham sido encaminhados para angiografia coronária e que foram seguidos durante 7 anos demonstrou que a diminuição dos níveis séricos de 25(OH)D estava associada a um risco aumentado de mortalidade global e em particular cardiovascular (Alves *et al.*, 2013; Dobnig *et al.*, 2008).

Martins *et al.* (2007) realizaram um estudo para avaliar a relação entre o risco cardiovascular e os níveis de 25(OH)D em 15 088 indivíduos (Martins *et al.*, 2007; Santos, 2011). Verificaram a existência de uma associação inversa entre os níveis de 25 (OH)D e a ocorrência/presença de hipertensão, diabetes mellitus e obesidade (Martins *et al.*, 2007; Santos, 2011). Outro trabalho, com um grupo de 283 doentes que apresentavam um elevado risco para desenvolver patologias das artérias coronárias, verificou haver uma correlação positiva entre os níveis baixos de vitamina D e o aumento da calcificação das artérias coronárias (Santos, 2011; Watson *et al.*, 1997).

Para além dos estudos anteriormente referenciados, uma série de outros de grande dimensão tem vindo a ser realizados ao longo dos anos, que têm contribuído em muito para melhorar a compreensão da correlação entre a vitamina D e as patologias cardiovasculares (Pilz *et al.*, 2008a; Pilz *et al.*, 2008b; Santos, 2011; Giovannucci *et al.*,

2008; Kumar *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008; Melamed *et al.*, 2008). A grande maioria destes estudos revelaram uma correlação positiva entre défices de vitamina D e a ocorrência de doenças cardiovasculares.

Comparativamente aos estudos anteriormente referenciados em que se verificaram correlações positivas relevantes entre défices de vitamina D e doenças cardiovascular, um inquérito nacional coreano realizado entre os anos de 2008 e 2009 identificou uma associação fraca entre os níveis baixos de vitamina D e maior mortalidade por DCV (Lichtenstein *et al.*, 2013; Thacher & Clarke, 2011; Wang *et al.*, 2008).

Apesar da existência de bastantes estudos sobre a correlação entre a vitamina D e as doenças cardiovasculares, estes apresentam uma série de limitações metodológicas inerentes aos estudos observacionais, que condicionam em muito a demonstração clara da correlação causa-efeito existente entre o défice de vitamina D e a ocorrência/mortalidade por doenças cardiovasculares (Lichtenstein *et al.*, 2013; Santos, 2011). Esta situação prende-se com o facto de muitas das doenças cardiovasculares, e em particular, a mortalidade associada a estas, estar associada a determinados fatores que também condicionam a produção de vitamina D. Esta situação aliada ao facto de as doenças cardiovasculares por si só potenciarem a redução da atividade física e consequente exposição solar, fator preponderante na produção de vitamina D, leva a uma potencial interferência nos resultados obtidos (Santos, 2011).

Outro aspeto avaliado em relação a vitamina D e as doenças cardiovasculares é o potencial benefício existente da suplementação com este composto na prevenção/ocorrência de doenças cardiovasculares. Um dos estudos realizados nesta área foi desenvolvido por Pittas *et al.* (2010). Verificou que no caso concreto da hipertensão arterial, não ocorriam variações significativas nos valores de PA sistólica e diastólica entre indivíduos que receberam placebo ou vitamina D, apesar de se terem verificado variações significativas ao nível dos níveis séricos de 25(OH)D₃ (Pittas *et al.*, 2010a; Santos, 2011). Além desta conclusão, verificou que não existia benefício significativo entre a toma de suplementos de vitamina D e a ocorrência de enfarte agudo do miocárdio (EAM), acidente vascular encefálico (AVE) e acidente isquémico transitório (AIT) (Pittas *et al.*, 2010a; Santos, 2011). Outro estudo realizado por Rejnmark *et al.* (2012) concluiu que houve uma redução significativa de todas as consequências associadas a doenças cardiovasculares nos indivíduos que receberam vitamina D + cálcio. No entanto, nos

indivíduos que apenas receberam vitamina D não se verificou um efeito significativo (Rejnmark *et al.*, 2012; Santos, 2011).

De forma a avaliar também este parâmetro, Gepner *et al.* (2012) realizaram um estudo no qual foi efetuado o doseamento de proteína C reactiva (PCR) e medidos os fluxos arteriais de 114 mulheres que receberam 25 000 UI de vitamina D₃ ou placebo (Gepner *et al.*, 2012; Santos, 2011). Não se verificou uma diferença significativa entre os valores de PCR encontrados e os fluxos arteriais entre as mulheres que receberam vitamina D₃ ou placebo (Gepner *et al.*, 2012; Santos, 2011). Uma revisão sistemática onde foi reunida a literatura existente sobre esta temática, constatou que a suplementação com vitamina D em doses moderadas a elevadas tende a reduzir o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares, comparativamente aos suplementos de cálcio que apresentam um efeito reduzido (Santos, 2011; Wang *et al.*, 2010). Muitos outros estudos nesta área têm sido realizados, no entanto os resultados obtidos são muito diversificados não sendo possível constatar a existência de benefícios com a suplementação com vitamina D (Bolland *et al.*, 2008; Ertugrul *et al.*, 2011; Hsia *et al.*, 2007; Pittas *et al.*, 2007; Santos, 2011; Sugden *et al.*, 2008).

A hipertensão arterial (HTA) apresenta-se como um dos grandes fatores de risco para o desenvolvimento de DCV. A deficiência ou níveis baixos de vitamina D têm sido associada com o desenvolvimento de hipertensão, bem como no desenvolvimento de complicações cardiovasculares associadas à hipertensão (Kristal-Boneh *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002; Martini & Wood, 2008; Schuch *et al.*, 2009; Scragg *et al.*, 2007; Forman *et al.*, 2008). Um estudo realizado pela *Intersalt Cooperative Research Group* sobre fatores de risco e controlo da hipertensão, com mais 100000 indivíduos de diversos países, revelou que os valores de pressão arterial sistólica e diastólica estavam positivamente associados com a distância ao equador dos países incluídos no estudo (INTERSALT, 1988). Foi possível constatar que a exposição solar e, consequentemente, a menor concentração de 25(OH)D estaria relacionadas com a pressão arterial. Paralelamente a este estudo outros corroboraram os resultados deste, revelando que pacientes hipertensos submetidos a radiação ultravioleta três vezes por semana, durante três meses, apresentavam um aumento de 180% nos níveis séricos de 25(OH)D e uma redução de 6 mmHg na pressão arterial sistólica e diastólica (Abbas *et al.*, 2009; Forman *et al.*, 2008; INTERSALT, 1988; Krause *et al.*, 1998; Kristal-Boneh *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002; Martini & Wood, 2008; Schuch *et al.*, 2009; Scragg *et al.*, 2007).

Ao longo dos tempos têm sido desenvolvidos diversos estudos, epidemiológicos e *in vivo*, de forma a verificar e comprovar a possível associação entre a vitamina D, mais precisamente os níveis séricos de 25(OH)D, e o risco ou potenciação da ocorrência de HTA. Scragg *et al.* (2007), tendo por base os indivíduos com mais de 20 anos que tinham participado no estudo NHANES III, verificou que ocorriam valores de pressão arterial sistólica e diastólica menores (3,0 e 1,6 mmHg, respetivamente) nos indivíduos com níveis de 25(OH)D $\geq 85,7$ nmol/L, em comparação com indivíduos com níveis ≤ 40 nmol/L) (Schuch *et al.*, 2009; Scragg *et al.*, 2007). Complementarmente a estes resultados, Martins *et al.* (2007) verificaram que adultos americanos com níveis séricos de 25(OH)D baixos tinham uma prevalência de hipertensão 30% maior (Martins *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2009). Outro estudo avaliou 1484 mulheres que participaram do *Nurses' Health Study* verificou que a concentração de 25(OH)D era menor nos casos de hipertensão (25,6 ng/mL) do que nos controlos (27,3 ng/mL) (Forman *et al.*, 2008; Schuch *et al.*, 2009). Além disso constatou que as mulheres que apresentavam menores concentrações de vitamina D tinham um maior risco de desenvolver hipertensão do que as mulheres com valores mais elevados (Forman *et al.*, 2008; Schuch *et al.*, 2009).

Contrariamente aos estudos anteriores existem estudos que revelaram uma relação negativa entre níveis séricos de vitamina D e HTA (Forman *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2009). É o caso do estudo realizado por Forman *et al.* (2007) que utilizando os dados do *Health Professionals Followup Study (HPFS)* e do *Nurses' Health Study*, revelou esta relação negativa (Forman *et al.*, 2007, Schuch *et al.*, 2009). Neste estudo verificou-se que após quatro anos, o risco relativo para homens com níveis baixos de 25(OH)D desenvolverem hipertensão foi de 6,13 e nas mulheres de 2,67 (Forman *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2009). Após oito anos, os valores tenderam a diminuir, apresentando os homens um risco relativo de 3,53 e as mulheres de 1,7 (Forman *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2009).

Ao nível da eficácia da suplementação com vitamina D na prevenção de HTA, alguns estudos já foram desenvolvidos. Um estudo antigo realizado por Lind *et al.* (1987) avaliou indivíduos com suplementação de vitamina D e indivíduos a receber placebo. Verificou a redução na pressão arterial de 39 indivíduos hipertensos com a suplementação de vitamina D (Lind *et al.*, 1987; Schuch *et al.*, 2009). Essa redução também foi constatada num outro estudo, com mulheres idosas a receberem suplementação com cálcio e vitamina D (Pfeifer *et al.*, 2001; Schuch *et al.*, 2009). Outro estudo clínico

realizado por Kimura *et al.* (1999), verificou que a administração de 1,25(OH)₂D reduziu a pressão arterial, além da atividade da renina e dos níveis de angiotensina II (Kimura *et al.*, 1999; Schuch *et al.*, 2009). Apesar dos resultados alcançados por estes estudos existe a necessidade de avaliar os efeitos da suplementação em estudos de base populacional e também em subgrupos específicos, além de analisar os níveis de vitamina D necessários em diferentes populações para garantir o benefício máximo desta na pressão arterial (Schuch *et al.*, 2009).

Assim, apesar da existência de inúmeras evidências clínicas e experimentais acerca da relação entre a vitamina D, e em particular da sua deficiência, e o aumento do risco cardiovascular, não se pode concluir se esta associação apresenta uma relação causal (Nadir *et al.*, 2010; Santos, 2011). Desta forma, este ponto necessita de estudos mais profundos, sendo que apenas após a análise dos mais resultados se poderá efetuar alguma conclusão sobre o benefício da suplementação com vitamina D como terapêutica base na prevenção primária e secundária de DCV (Santos, 2011).

6.3. Vitamina D e Diabetes *mellitus*

Existem diversos estudos que apontam para que a vitamina D tenha efeitos benéficos ao nível do tratamento e prevenção da diabetes (Pereira & Almeida, 2008, Santos, 2011). Esta situação prende-se com as ações a nível imunológico que a vitamina D apresenta. Está demonstrado que o calcitriol modula a síntese e secreção de insulina, regulando também a expressão do gene do recetor da insulina, sendo assim a útil em doentes com diabetes tipo 1 (Pereira & Almeida, 2008; Santos, 2011; Thacher *et al.*, 2011). Pensa-se que a presença de vitamina D nas células β pancreáticas pode melhorar a sua atividade, quer diretamente por meio dos seus recetores quer indiretamente através da homeostase do cálcio (Pereira & Almeida, 2008; Santos, 2011; Thacher *et al.*, 2011; Zittermann, 2003). Também têm sido relatada a ação direta da 1,25-dihidroxitamina D que pode conduzir ao aumento da expressão do recetor da insulina e melhor a capacidade de resposta à mesma para proteínas do tipo GLUT (proteínas transportadoras de glicose) (Khan *et al.*, 2013). Para além destes benefícios, esta afeta também a secreção e sensibilidade a insulina, nomeadamente aumenta a secreção e sensibilidade (Pereira & Almeida, 2008; Pittas *et al.*, 2007; Santos, 2011; Thacher *et al.*, 2011; Zittermann, 2003). Deste modo, as evidências sugerem que a vitamina D desempenha um papel na

patogénese e na prevenção dos tipos de diabetes (1 e 2) (Palomer *et al.*, 2008; Pereira & Almeida, 2008; Reis *et al.*, 2009).

Um estudo realizado com 524 adultos não diabéticos que foram seguidos durante 10 anos verificou uma associação inversa entre os níveis de 25(OH)D e o desenvolvimento de anomalias na glicemia e de ocorrência de insulinoresistência (Forouhi *et al.*, 2008; Pereira & Almeida, 2008). Um outro estudo realizado pelo *National Health and Nutrition Survey* (NHANES), dos EUA, acompanhou 9773 indivíduos tendo verificado que ocorria uma relação inversa entre os níveis séricos de 25(OH)D, a prevalência de diabetes *mellitus* tipo 2 e resistência a insulina, relação que permanecia mesmo após controlo de outras variáveis (Looker *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2007; Pereira & Almeida, 2008).

Numa revisão sistemática/metanálise realizada por Park *et al.* (2010), os resultados obtidos revelaram que níveis elevados de vitamina D entre indivíduos de meia-idade e populações idosas estavam associados com uma diminuição substancial na ocorrência de diabetes *mellitus* do tipo 2, quando comparado com os indivíduos com baixos níveis de 25(OH)D (Parker *et al.*, 2010; Pereira & Almeida, 2008). No entanto esta relação só se tornava significativa quando removidos da amostra dados relativos a indivíduos negros. Dado que, um estudo incluído nesta revisão sistemática revelou uma relação direta entre altos níveis de vitamina D e o aumento da prevalência de diabetes em indivíduos negros, o que contrariava a conclusão anterior (Parker *et al.*, 2010; Pereira & Almeida, 2008). Uma outra revisão sistemática/metanálise realizada verificou uma relação inversa entre a incidência de diabetes *mellitus* tipo 2 quando comparados grupos com maior ou menor ingestão combinada de vitamina D e cálcio (Pereira & Almeida, 2008; Pittas *et al.*, 2007).

Dois outros estudos realizados por Pittas *et al.* (2006, 2010) pretenderam avaliar a relação existente entre a concentração de 25(OH)D ou presença de vitamina D e cálcio e risco de desenvolver diabetes tipo 2 em mulheres (Khan *et al.*, 2013; Pittas *et al.*, 2006; Pittas *et al.*, 2010b; Mitri *et al.*, 2011). No caso concreto das concentrações de 25(OH)D, verificou-se que elevadas concentrações desta substância no plasma estavam associadas a um baixo risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Khan *et al.*, 2013; Pittas *et al.*, 2006; Pittas *et al.*, 2010b; Mitri *et al.*, 2011). Quanto à presença de vitamina D e cálcio, os resultados deste estudo sugerem um potencial papel benéfico tanto da ingestão de

vitamina D como de cálcio na redução do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Khan *et al.*, 2013; Mitri *et al.*, 2011; Pittas *et al.*, 2006; Pittas *et al.*, 2010b).

Para além dos estudos prospetivos e revisões sistemáticas/metanálise mencionados anteriormente, muitos outros estudos têm abordado esta temática. Na sua generalidade verificaram uma relação positiva entre as elevadas concentrações de 25(OH)D e um baixo risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Hyppönen *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2013; Pittas *et al.*, 2010a).

Um fator a ter em conta na diabetes é o desenvolvimento de insulinoresistência. Alguns estudos já avaliaram a possível relação entre os níveis de vitamina D (25(OH)D) e o desenvolvimento de insulinoresistência. Trabalhos realizados por Forouhi *et al.* (2008) e Kayaniyil *et al.* (2011) relataram associações inversas entre os níveis séricos de 25(OH)D e desenvolvimento de níveis anormais de glicemia e resistência à insulina. Estas associações poderão ser potencialmente importantes na compreensão da etiologia e do metabolismo anormal da glicose (Forouhi *et al.*, 2008; Kayaniyil *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013).

À semelhança do verificado nas patologias anteriores, a suplementação com vitamina D e a sua influência no desenvolvimento de diabetes, foi também avaliada em diversos estudos. Num estudo de coorte, realizado por Hyppönen *et al.* (2001), no qual foram avaliadas 10 366 crianças que foram alvo de suplementação com vitamina D com doses diárias de 2.000 UI, verificou uma redução de 78% no risco de desenvolver diabetes tipo 1, comparativamente quando eram alvo de suplementação com doses mais baixas de vitamina D (Hyppönen *et al.*, 2001; Lichtenstein *et al.*, 2013). Uma metanálise realizada por Zipitis & Akobeng (2008), onde foram avaliados 4 estudos, com um total de 1429 casos e 5026 controlos, verificou que crianças que receberam suplementos de vitamina D obtiveram uma redução no risco de desenvolver diabetes tipo 1 de 29%, quando comparadas com crianças que não receberam suplementos de vitamina D (Lichtenstein *et al.*, 2013; Zipitis & Akobeng, 2008). Na metanálise realizada por Pittas *et al.* (2007), dos estudos incluídos, apenas um estudo realizado em 20 indivíduos diabéticos do tipo 2, revelou um resultado positivo quanto a suplementação com vitamina D, tendo demonstrado uma melhoria na secreção de insulina e peptídeo C nos doentes recém-diagnosticados. Estes resultados sugerem que a vitamina D poderá ser importante para retardar a progressão da doença (Pittas *et al.*, 2007; Santos, 2011).

Outras metanálises/revisões sistemáticas e estudos experimentais têm revelado resultados muito controversos quanto ao benefício significativo ou não da suplementação com vitamina D no desenvolvimento de diabetes e outras patologias metabólicas. Esta situação torna evidente a necessidade de estudos mais profundos nesta área (Lichtenstein *et al.*, 2013; Santos, 2011).

6.4. Vitamina D e Obesidade

A presença de concentrações baixas de 25(OH)D em indivíduos obesos é extremamente comum, sendo esta situação muitas vezes devida à menor exposição solar destes pacientes (Schuch *et al.*, 2009; Arunabh *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 1985; Kimmons *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 1994, Snijder *et al.*, 2005). No entanto, atualmente supõe-se que estas baixas concentrações de vitamina D não sejam apenas consequência da menor exposição solar, mas também devidas à acumulação de gordura corporal (Schuch *et al.*, 2009). Várias evidências científicas apontam para que uma possível causa dos valores baixos de 25 (OH)D em indivíduos obesos seja o depósito de vitamina D nos adipócitos, que conduz a uma diminuição da sua biodisponibilidade e consequentemente a uma ativação do hipotálamo para a realização de uma série de reações que conduzem a um aumento da sensação de fome e diminuição do gasto energético (Schuch *et al.*, 2009; Sun & Zemel, 2008).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos de forma a verificar estas possíveis correlações. Uma correlação negativa entre a percentagem de gordura corporal total e a concentração sérica de 25 (OH)D foi verificada por estudos de base populacional, tendo-se mantido mesmo quando eram efetuados ajustes para idade, estação do ano, ingestão de vitamina D e raça (Schuch *et al.*, 2009; Snijder *et al.*, 2005).

Snijder *et al.* (2005) realizou um estudo no *Longitudinal Aging Study Amsterdam* (LASA), tendo verificado que a soma das dobras cutâneas e a percentagem de gordura corporal estavam fortemente associadas a baixas concentrações de 25(OH)D e a uma maior concentração de PTH, este último parâmetro tinha já sido comprovado por um outro estudo realizado por Bell *et al.* (1985) (Bell *et al.*, 1985; Schuch *et al.*, 2009; Snijder *et al.*, 2005). A secreção de PTH funciona como um sinal para que se realize a hidroxilação da 25(OH)D no rim de forma a originar a forma ativa da vitamina D (Schuch *et al.*, 2009). Alguns autores sugerem que dada a elevação nos níveis de 1,25(OH)₂D,

ocorre um feedback negativo da síntese hepática de 25(OH)D (Schuch *et al.*, 2009). Um estudo posterior no qual foram avaliadas as concentrações de micronutrientes presentes em homens e mulheres que participaram do *National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III), revelou que apenas nas mulheres em pré e pós-menopausa se verificava uma associação negativa da vitamina D com o IMC (Kimmons *et al.*, 2006; Schuch *et al.*, 2009).

A relação entre a suplementação com vitamina D e obesidade também têm sido alvo de estudos. Um estudo realizado em 2007 por Caan *et al.*, no qual foram obtidos dados de 36 282 mulheres em pós-menopausa com idades compreendidas entre os 50 e 79 anos, participantes do *Women's Health Initiative* (WHI), verificou-se um menor ganho de peso nas mulheres alvo de suplementação (1.000 mg de cálcio e 400UI de colecalciferol) quando comparadas com as mulheres que não receberam suplementação (Caan *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2009). Num estudo realizado com 445 indivíduos de idades entre os 21 e 70 anos e com um IMC entre 28 e 47 kg/m², os participantes foram divididos em 3 grupos: um grupo recebeu suplementação com colecalciferol 20.000 UI duas vezes por semana, outro recebeu 20.000 UI uma vez por semana e placebo uma vez por semana e o último grupo recebeu apenas placebo duas vezes por semana (Schuch *et al.*, 2009; Sneve *et al.*, 2008). Todos os indivíduos foram alvo de suplementação com 500 mg de cálcio (Schuch *et al.*, 2009; Sneve *et al.*, 2008). Através dos resultados obtidos verificou-se que nos indivíduos alvo de suplementação com colecalciferol, independentemente da dose administrada, ocorria um aumento significativo das concentrações séricas de 25(OH)D e a redução no PTH, contudo, não se verificavam alterações ao nível do peso, relação cintura-quadril e percentagem de gordura corporal (Schuch *et al.*, 2009; Sneve *et al.*, 2008). Dado o número reduzido de estudos nesta área, a realização de estudos que visem avaliar os possíveis efeitos associados à suplementação com vitamina D na prevenção da obesidade são cruciais.

6.5. Vitamina D e Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla é descrita como uma doença inflamatória, autoimune, desmielinizante e degenerativa do sistema nervoso central (SNC), que apresenta uma distribuição geográfica e étnica caracterizada por uma maior prevalência ao nível dos países do hemisfério norte, particularmente na população de origem caucasiana (Brum *et al.*, 2014). Dado o tipo de clima associado ao hemisfério norte, ou seja, um clima

predominantemente temperado, onde se verificam períodos de pouca radiação solar, aliado a uma alta prevalência de deficiência em vitamina D que se têm constatado em diversos estudos, a deficiência em vitamina D têm sido apontada como a hipótese mais credível para justificar a distribuição geográfica característica da esclerose múltipla. Para além das situações anteriores, identificou-se também que a presença de uma adequada concentração sérica de vitamina D poderá contribuir para a redução do risco desta patologia (Brum *et al.*, 2014; Goldberg *et al.*, 1986; Hossein-nezhad & Holick, 2013).

Munger (2006) realizou um estudo onde pretendeu avaliar a possível associação entre os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D e o risco de desenvolver esclerose múltipla (Lichtenstein *et al.*, 2013; Munger *et al.*, 2006). Neste estudo foi avaliado o risco de esclerose múltipla numa população branca de 148 doentes e 296 casos controlo, tendo-se verificado que o risco de esclerose múltipla era de 51% mais baixo em indivíduos que apresentavam níveis de 25(OH)D > 40 ng/mL, comparativamente com indivíduos com níveis < 30 ng/mL (Lichtenstein *et al.*, 2013; Munger *et al.*, 2006). Outro estudo realizado por Kragt (2009), onde foram avaliados 103 doentes e 110 controlos, revelou que por cada aumento sérico de 4 ng/mL nos níveis de 25(OH)D, ocorria uma redução de 19% na probabilidade de desenvolver esclerose múltipla (Kragt *et al.*, 2009; Lichtenstein *et al.*, 2013). Martinelli *et al.* (2014) desenvolveu um estudo semelhante aos anteriores, mas neste caso em indivíduos com síndromes clínicos isolados (CIS) (Martinelli *et al.*, 2014). Este estudo tinha como objetivo avaliar os níveis de vitamina D em indivíduos com CIS e correlacioná-lo com o risco de desenvolver esclerose múltipla (Martinelli *et al.*, 2014). Os resultados obtidos indicaram que indivíduos com CIS que apresentavam baixos níveis de vitamina D tinha um risco acrescido para o desenvolvimento de esclerose múltipla (Martinelli *et al.*, 2014).

Ao nível da suplementação com vitamina D, a sua relação com o risco de desenvolvimento de esclerose múltipla tem vindo a ser avaliado. Um estudo realizado na Noruega onde foram acompanhados 70 doentes dos quais 35 usaram 20000 UI de vitamina D₃ (colecalfiferol) por semana associado a 500 mg/dia de cálcio, enquanto os restantes usaram apenas 500 mg/dia de cálcio durante dois anos (Brum *et al.*, 2014; Kampman *et al.*, 2012). Não foram observadas diferenças entre o grupo que usou vitamina D e o que não usou, no que respeita à taxa anual de crises ou à modificação da capacidade funcional (Brum *et al.*, 2014; Kampman *et al.*, 2012). Uma metanálise realizado por James *et al.* (2013) concluiu que não existia uma relação positiva entre o

tratamento com altas doses de vitamina D e risco de ocorrência de esclerose múltipla (James *et al.*, 2013). Os resultados dos estudos existentes entre a relação da suplementação com vitamina D e o benefício ou não para o desenvolvimento de esclerose múltipla não são conclusivos, não justificando por si só o uso de suplementação de vitamina D como monoterapia no tratamento de esclerose múltipla (Brum *et al.*, 2014).

6.6. Vitamina D e Risco de Quedas/Fraturas

A deficiência em vitamina D, bem como a suplementação, são aspectos muito correlacionados com alterações positivas ou negativas ao nível neuromuscular e consequentemente com um maior/menor risco de quedas/fraturas, principalmente em idosos (Lichtenstein *et al.*, 2013; Janssen *et al.*, 2002).

A possível relação existente entre a vitamina D e a menor ou maior incidência de quedas/fraturas prendem-se com:

- Presença de recetores nos músculos para a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$;
- Associação entre a vitamina D e a síntese proteica a nível muscular;
- Melhoria da função muscular pela vitamina D, com redução do risco de quedas principalmente se for associado ao cálcio;
- Indução pela PTH (deficiência de vitamina D) do catabolismo muscular, o que pode conduzir a lesão do músculo;
- Diminuição de reflexos em indivíduos com deficiência de vitamina D que poderia explicar uma queda independente da presença de uma lesão muscular (Bischoff *et al.*, 2003; Pedrosa & Castro, 2005).

A possível associação entre a vitamina D e o risco de quedas/fraturas é em muito justificada pelos efeitos que a vitamina D evidencia ao nível da função neuromuscular, em particular no músculo-esquelético (Pedrosa & Castro, 2005). Esta situação é muito evidente e significativa nos idosos, faixa etária onde se verifica uma elevada prevalência de deficiência em vitamina D (Pedrosa & Castro, 2005). Níveis baixos de vitamina D em pessoas acima dos 65 anos ocorrem em cerca de 40-50% de indivíduos que não sofreram quedas (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005). Este valor sobe para 70% quando se trata de indivíduos com tendência a quedas (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005). Aliada a este défice de vitamina D, os idosos apresentam com frequência diminuição da massa muscular que conduz a uma diminuição da força muscular, e

consequente aumento do risco de quedas/fraturas (Pedrosa & Castro, 2005). Ao nível da diminuição da força muscular as evidências sugerem que esta não é prevenida pela suplementação com vitamina D (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005). Aliados ao facto anterior existem também evidências que indicam que em comorbilidades que causam fraqueza muscular, esta também não melhora com suplementação (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005)

Numa revisão acerca de fatores causais envolvidos na ocorrência de quedas, os autores identificaram uma associação entre a deficiência de vitamina D e a ocorrência de alterações musculares (Annweiler *et al.*, 2010; Lichtenstein *et al.*, 2013). No entanto, esta correlação não se mantinha quando eram realizados ajustes para outras variáveis (ex.: idade, atividade física, IMC, doenças crónicas) (Annweiler *et al.*, 2010; Lichtenstein *et al.*, 2013).

Ao nível das quedas/fraturas, os estudos incidiram sobre os efeitos da suplementação com vitamina D e a incidência destas situações. As primeiras evidências prendem-se com os efeitos da suplementação ao nível neuromuscular, verificando-se uma possível correlação entre a sua melhoria e os níveis antes da suplementação (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005).

Pfeifer *et al.* (2000) realizou um estudo em 148 mulheres idosas que apresentavam deficiência em vitamina D (< 20 ng/mL), tendo verificado uma melhoria significativa com suplementação com vitamina D e cálcio acompanhados durante um anos, facto que foi menos significativo nos indivíduos alvo apenas de suplementação com cálcio (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005; Pfeifer *et al.*, 2000). Um estudo semelhante constatou que em 354 holandeses institucionalizados com mais de 70 anos a receberem suplementação de 400 UI/dia de vitamina não ocorria diminuição no risco de quedas (Dawson-Hughes *et al.*, 1997; Lichtenstein *et al.*, 2013). Para além desta constatação, outro estudo onde foram comparados indivíduos a receber suplementação com outros a receber apenas placebo, a suplementação não influenciou a ocorrência de quedas em 389 idosos (Dawson-Hughes *et al.*, 1997; Lichtenstein *et al.*, 2013). Um estudo realizado com 3717 idosos institucionalizados verificou que não existia a redução nas quedas ou fraturas (Lichtenstein *et al.*, 2013).

Os dados anteriores apontaram a institucionalização como um dos fatores para falta de eficácia da suplementação com vitamina D na prevenção da ocorrência de quedas/fraturas, devido ao facto de se encontrarem num ambiente de maior controlo (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005). No entanto estudos posteriores, como o realizado por Venning (2005), constataram que o facto de não se ter verificado influência da suplementação no risco de ocorrência de quedas, não se devia à situação anterior mas sim à utilização de doses baixas na suplementação (Lichtenstein *et al.*, 2013; Venning, 2005). Esta situação tornou-se ainda mais evidente noutros estudos com doentes institucionalizados, no qual se constatou um influência significativa da suplementação com vitamina D no risco de quedas/fraturas quando utilizadas doses de 800 UI/dia (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005).

Dhesij *et al.* (2004) realizou um estudo com 139 indivíduos com idade superior a 65 anos que apresentavam uma história de quedas e níveis séricos de vitamina D < 12 ng/mL, a quem foram administradas 600000 UI de ergocalciferol intramuscular (Lichtenstein *et al.*, 2013). Neste estudo verificou-se que com a suplementação ocorria uma melhoria na performance neuromuscular funcional, no tempo de reação psicomotora e no equilíbrio, contrapondo com a força muscular e frequência de quedas, parâmetros para os quais não se verificou alteração significativa (Lichtenstein *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem assim que a vitamina D têm ação a nível neuromuscular mas não nas quedas/fraturas. Também um estudo mais recente realizado por Sanders *et al.* (2010), em que foram administradas elevadas doses anuais de vitamina D (500000 UI/ano) não verificou qualquer alteração ao nível da redução de quedas em 2256 idosas não institucionalizadas, tendo-se um aumento de quedas (Lichtenstein *et al.*, 2013; Sanders *et al.*, 2010).

Têm sido realizadas algumas metanálises nas quais foram reunidos diferentes estudos sobre a influência da suplementação com vitamina D nas quedas/fraturas. Um dessas metanálises foi realizada por Bischoff-Ferrari *et al.* (2004), na qual foram incluídos 5 estudos, com um total de 1237 idosos com condições de saúde estáveis. Conclui-se que a reposição de vitamina D reduzia em 22% as quedas comparativamente à suplementação apenas com cálcio ou placebo (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2004; Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005). No entanto, os resultados anteriores só foram significativos para mulheres (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2004; Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005). Numa outra metanálise, verificou-se a ocorrência de uma diminuição de quedas

quando ocorreu suplementação com doses de 700 UI/dia ou superiores (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2009; Lichtenstein *et al.*, 2013). Para além dos resultados anteriores, verificou-se que quando os níveis séricos eram inferiores a 24 ng/mL, as quedas não eram evitadas (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2009; Lichtenstein *et al.*, 2013). Foi ainda comprovada a não influência da suplementação com cálcio nos resultados observados (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2009; Lichtenstein *et al.*, 2013).

Apesar dos estudos indicarem uma possível influência da presença de uma deficiência em vitamina D num risco aumentado de quedas/fraturas, os estudos apresentam algumas variáveis que impedem uma constatação direta e clara (Lichtenstein *et al.*, 2013; Pedrosa & Castro, 2005). Os resultados obtidos indiciam assim que a deficiência em vitamina D apresenta influência ao nível das quedas, devido à ação da vitamina D na função neuromuscular e não na força muscular. Ao nível da suplementação os resultados são contraditórios, no entanto revelam que a dose utilizada e os níveis séricos presentes antes da suplementação influenciam os resultados observados.

7. Deficiência em Vitamina D

7.1. Definição e Epidemiologia

Atualmente, a deficiência em vitamina D pode e deve ser encarrada como um importante problema de saúde pública, dadas as implicações que apresenta no desenvolvimento de outras patologias (Bosomworth, 2011; Goldstein, 2009; Kimball *et al.*, 2008). A deficiência em vitamina D surge como uma das situações mais comuns e não diagnosticada, havendo estudos que apontam que em todo mundo existam aproximadamente um bilhão de indivíduos com esta deficiência, destacando-se os idosos como a faixa etária mais afetada (James, 2008).

A variabilidade encontrada nos valores limiares de vitamina D indicados para os indivíduos associada às várias nomenclaturas utilizadas na descrição da deficiência em Vitamina D, levam a que sejam usadas diferentes designações para esta situação clínica, nomeadamente, insuficiência, deficiência ou hipovitaminose (Alves *et al.*, 2013). Para além destes fatores, outros dificultam a classificação desta patologia, nomeadamente, diferenças entre métodos laboratoriais passíveis de serem usados e a ausência de valores padrão que sejam aceites globalmente (Alves *et al.*, 2013).

Como já referenciado, os valores de 25(OH)D são os que fornecem uma informação mais fidedigna acerca das concentrações de vitamina D existente no organismo, sendo a partir deles que se identifica esta situação clínica havendo, no entanto, a problemática de não existirem valores padrão de 25(OH)D globalmente aceites (Alves *et al.*, 2013).

Os primeiros estudos realizados sobre a deficiência em vitamina D utilizavam como valores padrão os definidos no laboratório Nichlos, que indicava valores entre 23-113 nmol/L (9,2-45,2 ng/L) para se considerar a presença de deficiência de vitamina D (Malabanan *et al.*, 1998; Premaor & Furlanetto, 2006). No entanto, na década de 90, desenvolveu um estudo onde verificou que níveis de 25(OH)D inferiores a 50 nmol/L eram suficientes para provocar um aumento da PTH e perda da massa óssea (Malabanan *et al.*, 1998; Pedrosa & Castro, 2005). A partir destes resultados, Holick sugeriu que a deficiência de vitamina D fosse definida quando se verificassem níveis séricos de 25(OH)D iguais ou inferiores a 50 nmol/L (20 ng/L), sendo considerada grave quando se verificassem valores inferiores 25 nmol/L (Malabanan *et al.*, 1998; Premaor & Furlanetto, 2006). Apesar destes valores parecerem adequados, não existe ainda um consenso, tendendo os valores a variar de autor para autor. A maioria dos autores adota valores entre 50-74 nmol/L para insuficiência, entre 25 e 50 nmol/L para deficiência moderada e inferiores a 25 nmol/L para deficiência grave (Bosomworth, 2011; Mosekilde, 2005; Premaor & Furlanetto, 2006; Pedrosa & Castro, 2005). No entanto, para que se considere hipovitaminose é necessário que haja para além de valores baixos de vitamina D, a presença de hiperparatiroidismo secundário (Bosomworth, 2011; Mosekilde, 2005; Premaor & Furlanetto, 2006; Pedrosa & Castro, 2005).

No que respeita aos níveis ótimos ou ideais de 25(OH)D que devem existir no organismo, estes correspondem aos valores em que a absorção de cálcio está otimizada, os níveis de PTH existentes são reduzidos e conduzam a um benefício mais significativo para o osso e função muscular (Alves *et al.*, 2013; Holick *et al.*, 2011). Atualmente, recomenda-se que os valores de 25(OH)D sejam superiores a 30 ng/mL (75 nmol /L) (Alves *et al.*, 2013; Bosomworth, 2011; Holick *et al.*, 2011). Quando este limiar é utilizado na definição de défice de vitamina D, a prevalência tende a ser bastante elevada, situando-se entre 52 a 77% (Alves *et al.*, 2013, Ginde *et al.*, 2009; Lips *et al.*, 2006; Orwoll *et al.*, 2009). Por outro lado, quando se define deficiência com valores inferiores a 20 ng/ml (limiar menos restrito), a prevalência situa-se entre 18-36% (Alves *et al.*, 2013; Looker *et al.*, 2008).

Dada a existência de diferentes métodos de análise, aliada aos diferentes limiares que são definidos é difícil caracterizar a prevalência atual desta patologia (Alves *et al.*, 2013). No entanto, é possível constatar que os valores de prevalência registados são bastante elevados e com tendência a aumentar com o decorrer dos tempos.

7.2. Fatores de risco /causas

Sendo a principal via de obtenção da vitamina D endógena (produção de vitamina D por exposição à luz solar) os níveis de vitamina D, e em particular de 25(OH)D, serão afetados por qualquer alteração ao nível da transmissão da radiação UVB ou da sua penetração na pele (Tabela II). Para além desta situação, os níveis de vitamina D séricos podem ser afetados por défices dietéticos advindos da existência de um número reduzido de fontes alimentares e de conteúdo escasso em vitamina D₂ e D₃. Outras situações que podem despontar a existência de uma deficiência em vitamina D incluem alterações que afetam a biodisponibilidade, o metabolismo e a síntese quer de 25(OH)D quer de 1,25(OH)₂D.

Tabela II – Principais causas de deficiência em vitamina D (adaptado de Alves *et al.*, 2013; Bosomworth, 2011; Premaor & Furlanetto, 2006; Urrutia-Pereira & Solé, 2015).

Diminuição da exposição cutânea	<ul style="list-style-type: none"> - Latitude, tempo exposição, hora do dia, estação do ano - Uso de protetor solar, pele escura, envelhecimento - Urbanização e poluição, tipo de vestuário, danos na pele (queimaduras)
Diminuição da biodisponibilidade	<ul style="list-style-type: none"> - Síndromes de malabsorção (doença inflamatória intestinal, doença celíaca, doença biliar, polipose intestinal) - Obesidade – sequestro da vitamina D pelo tecido adiposo - Alimentação, amamentação exclusiva
Aumento do metabolismo	<ul style="list-style-type: none"> - Fármacos: antiepilépticos, antiretrovirais, glucocorticóides, ... - Doenças granulomatosas crónicas: tuberculose, sarcoidose,
Diminuição de síntese de 25(OH)D	<ul style="list-style-type: none"> - Insuficiência hepática severa
Aumento da perda de 25(OH)D	<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome nefrótica
Diminuição da síntese de 1,25(OH)₂D	<ul style="list-style-type: none"> - Doença renal crónica – estádios 4 e 5

Dadas as causas/fatores de risco apresentados para a deficiência de vitamina D, a literatura sugere a realização de rastreios, ou seja, o doseamento da 25 (OH)D, para

determinados grupos de risco e não para a população em geral (Alves *et al.*, 2013). De entre os grupos de risco que devem ser alvo de rastreios destacam-se os idosos, indivíduos institucionalizados, grávidas e mulheres em pós-menopausa (Alves *et al.*, 2013). Estes grupos destacam-se por terem associados a si um conjunto de fatores de risco que potenciam de forma mais evidente o desenvolvimento deste tipo de défice.

7.3.Sintomas/ Consequências associadas à deficiência em Vitamina D

A presença de baixos níveis séricos de vitamina D estão associados a uma grande variedade de efeitos/consequências ao nível da saúde. Dada a grande variedade de sinais clínicos e sintomas desta deficiência de natureza não específica, o diagnóstico da patologia é um pouco difícil. Para que o diagnóstico seja possível através dos sinais e sintomas, os níveis de vitamina D no soro devem permanecer em níveis muito reduzidos durante um longo período de tempo, para que o indivíduo desenvolva os sintomas e sinais clássicos associados a deficiência em vitamina D, nomeadamente, raquitismo em crianças ou osteomalacia nos adultos (Holick, 1981). Para além destes sinais/sintomas, outros podem surgir, nomeadamente, maior incidência de infeções, letargia, irritação, agravamento de doenças crónicas (ex. artrite reumatóide), dores generalizadas, e em particular na região lombar, musculares e ósseas (Arvold *et al.*, 2009).

Atualmente verifica-se um aumento crescente do diagnóstico de deficiência em vitamina D em indivíduos portadores de doenças renais crónicas e em indivíduos que sofrem quedas frequentes e estão debilitados ao nível físico (Dharmarajan *et al.*, 2005; Flicker *et al.*, 2003). Neste caso, a situação prende-se com o facto de a deficiência em vitamina D prejudicar o relaxamento e contração muscular, provocando dor e fraqueza muscular, que podem aumentar o risco de quedas e paralelamente de fraturas (Premaor *et al.*, 2006).

Para além destas situações, outras doenças, nomeadamente de carácter autoimune, tais como, esclerose múltipla, doença do cólon irritável, asma e artrite reumatóide, bem como hipertensão e o aumento da mortalidade por DCV estão associadas a baixas concentrações séricas de vitamina D (Dobnig *et al.*, 2008; Souberbielle *et al.*, 2010).

Os níveis baixos de vitamina D, para além da influência manifestada nas situações e patologias anteriormente referenciadas, poderá levar ao desenvolvimento de outras

situações clínicas, nomeadamente, hipocalcemia e hipofosfatemia (Premaor & Furlanetto, 2006). Quando ocorre uma diminuição nos níveis de vitamina D ocorre uma redução da absorção a nível intestinal de cálcio, originando subsequentemente uma hipocalcemia (Premaor & Furlanetto, 2006). No entanto esta hipocalcemia é de curta duração, uma vez que, surge de imediato um hiperparatireoidismo compensatório, conduzindo desta forma a um aumento da mobilização do cálcio ósseo e diminuição da depuração renal do cálcio, aliado a um aumento da depuração do fosfato e uma diminuição da absorção ao nível intestinal de fosfato, surgindo uma hipofosfatemia (Premaor & Furlanetto, 2006).

De acordo com a gravidade e/ou duração da deficiência em vitamina D, o mecanismo compensatório anteriormente referenciado, pode deixar de existir, levando ao aparecimento de uma hipocalcemia (Premaor & Furlanetto, 2006). Por outro lado, quando se verifica uma deficiência de 25(OH)D pode verificar-se a presença de uma deficiência em simultâneo de 1,25(OH)₂D, devido a falta de substrato (Premaor & Furlanetto, 2006). Adicionalmente, pode verificar-se um aumento da fosfatase alcalina, conduzindo a perda de massa óssea e consequentemente a um aumento do risco de ocorrência de fraturas (Premaor & Furlanetto, 2006).

7.4.Tratamento da Deficiência em Vitamina D

Como referenciado anteriormente, uma das principais causas de deficiência em vitamina D prende-se com alterações ao nível da exposição solar e/ou fatores que prejudicam a sua ação ao nível da pele, que consequentemente vai prejudicar a síntese de vitamina D (Lips, 2001; Premaor & Furlanetto, 2006). Muitas vezes estas situações verificam-se devido à problemática do cancro da pele, que torna muito controversa a exposição solar prolongada de forma a prevenir/tratar a deficiência em vitamina D (Holick, 2007). No entanto, a exposição pelo menos de braços e pernas durante 5 a 30 minutos no período entre as 10 h da manhã e as 3 h da tarde são suficientes para prevenir a deficiência de vitamina D, advinda de alterações ao nível da exposição solar (Holick, 2007). Uma opção para contrabalançar as problemáticas advindas da exposição solar prolongada, seria a utilização de exposição à radiação UV artificial que apresenta uma elevada eficácia na biossíntese da vitamina D, porém não é prática a sua utilização (Cannell *et al.*, 2008; Premaor & Furlanetto, 2006).

Outra situação que pode ser condicionante da ocorrência de deficiência de vitamina D é uma dieta pobre em vitamina D, e que por vezes não consegue ser corrigida dada as

características geográficas da região de origem dos indivíduos (Cannell *et al.*, 2008; Premaor & Furlanetto, 2006).

Nestas duas situações, a suplementação oral com vitamina D apresenta-se como uma alternativa viável para corrigir os níveis de vitamina D séricos (Cannell *et al.*, 2008; Kauffman, 2009; Lips, 2001; Premaor & Furlanetto, 2006).

A vitamina D utilizada na suplementação/substituição da vitamina D proveniente de fontes naturais pode ser usada sobre duas formas principais: vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalfiferol) (Alves *et al.*, 2013; Cannell *et al.*, 2008). Portugal dispõe no mercado de uma série de suplementos vitamínicos/fármacos que contêm na sua constituição vitamina D, disponibilizada sobre a forma de vitamina D₂ ou D₃, em associação com outros compostos.

Diversos estudos evidenciam que as duas formas possuem efeitos equivalentes, aumentando os níveis séricos de 25(OH)D de forma semelhante (Alves *et al.*, 2013; Armas *et al.*, 2004; Romagnoli *et al.*, 2008). No entanto, a nível dos efeitos a longo prazo estas duas formas apresentam características diferentes. Apesar de até 3 dias após a ingestão o aumento nos níveis de 25(OH)D ser semelhante para as 2 formas, a vitamina D₃ proporcionam um aumento contínuo dos níveis de 25(OH)D durante 14 dias, altura em que atinge o seu máximo (Alves *et al.*, 2013; Armas *et al.*, 2004; Romagnoli *et al.*, 2008) enquanto que no caso da vitamina D₂ os valores após os 3 dias tendem a diminuir rapidamente, apresentando valores semelhantes aos verificados antes do tratamento após 14 dias (Alves *et al.*, 2013; Armas *et al.*, 2004; Romagnoli *et al.*, 2008).

Em termos de doses a administrar para a correção da deficiência em vitamina D estas dependem em muito da causa subjacente à deficiência, bem como da faixa etária e características dos indivíduos. Em Portugal, a Direção Geral de Saúde (DGS) aconselha a ingestão no caso de indivíduos com osteoporose com idades superiores a 65 anos de 700-800 UI por dia de vitamina D (Alves *et al.*, 2013). Outros estudos indicam por exemplo, no caso de doentes com doença renal crónica a ingestão de 1000 UI/Dia de vitamina D₃ (Holick, 2007). Desta forma, verifica-se que as doses a utilizar e a resposta às mesmas depende muito do indivíduo em causa, sendo por vezes necessário a monitorização constante dos níveis de vitamina D para se verificar se o tratamento está a surtir efeito (Holick, 2007).

Para além dos suplementos vitamínicos que o mercado disponibiliza, existem também fármacos que são utilizados na suplementação com vitamina D, cada um com indicações específicas. Portugal dispõe de algumas associações de vitamina D e outros compostos como, por exemplo, cálcio (Tabela III) e de 5 princípios ativos (Tabela IV) utilizados com estas funções.

Tabela III- Fármacos disponíveis em Portugal com associações entre a vitamina D₃ e outras substâncias.

Associação	Nome comercial
Vit D₃ + Carbonato de cálcio (400 UI + 1500 mg)	Densical D®; Natecal D®; Calcitab D®; Calcium D Sandoz®; Calcio+vitD3 Ratiopharm®
Vit D₃ + Carbonato de cálcio (400 UI + 1250 mg)	Ideos ®
Vit D₃ + hidrogenofosfato de cálcio (500 UI + 600 mg)	Decalcit ®
Vit D₃ + hidrogenofosfato cálcio + gluconato cálcio (100 UI + 250 mg + 250 mg)	Dagravit ®
Vit D₃ + ácido alendrónico (2800-5600 UI + 70 mg)	Fosavance ®; Adroavance ®

Tabela IV – Fármacos disponíveis em Portugal utilizados na suplementação de vitamina D e algumas das suas características (adaptado de Alves *et al.*, 2013).

Nome comercial	Vigantol ®	Dedrogyl ®	Rocaltrol ®	Etalpa ®	Zemplar ®
Princípio ativo	Colecalciferol	Calcifediol	Calcitriol	Alfacalcidol	Paricalcitol
Forma Farmacêutica	Solução Oral		Cápsulas	Solução Oral Cápsulas	Cápsulas Solução Injetável
Doses e composição	0,5 mg/mL (1 ml=30gotas=20000 UI de vit. D ₃)	0,15 mg/mL (1 mL =30 gotas)	0,25 µg	2 µg/mL (sol. oral) 0,25 µg, 0,5 µg ou 1 µg cápsulas)	1 µg ou 2 µg (cápsulas) 5 µg/mL (sol. Injetável)
Indicações	Carência em vitamina; osteodistrofia renal; hipoparatiroidismo; raquitismo				Prevenção e tratamento do hiperparatiroidismo associado à insuficiência renal crónica.
Posologia	Ajuste individual da dose diária, dependendo da calcemia A ingestão total de cálcio não deve exceder os 800mg/dia Dose inicial recomendada é variável, dependendo da situação clínica e do grupo etário, com ajuste periódico, após monitorização da calcemia.				Dose muito variável, dependendo das concentrações de PTH, de cálcio e fósforo séricos, da situação clínica e do grupo etário, com ajustes periódicos após a monitorização.
Outras informações relevantes		O tratamento é limitado a 7 dias, salvo casos excecionais	O seu uso requer cuidados especiais, incluindo a avaliação periódica do cálcio plasmático e o controlo adequado da ingestão de cálcio.	A solução injetável só deverá ser administrada após sessões de hemodiálise.	A via de administração habitual do medicamento é intravenosa durante a hemodiálise.

8. Métodos laboratoriais para o doseamento de vitamina D

A realização de uma análise quantitativa e qualitativa da vitamina D e dos seus metabolitos é crucial para uma avaliação correta das doses destes compostos no organismo humano. Desta forma, consegue-se um diagnóstico mais fidedigno, identificando possíveis deficiências e/ou carências de forma mais precisa e exata. Esta situação é ainda mais relevante quando existe algum tipo de patologia, permitindo instituir uma terapêutica mais correta, direcionada e eficaz.

A possibilidade de associação entre níveis séricos reduzidos de vitamina D e os seus metabolitos e algumas patologias levou a que o número de pedidos de medição dos níveis séricos de vitamina D, em particular entre grupos de risco, tenha aumentado dada a necessidade de assegurar no organismo a presença de níveis ideais deste composto. Neste sentido é crucial a existência de uma melhor concordância entre os diversos métodos, tanto para permitir uma comparação mais significativa entre os estudos de investigação, bem como para facilitar um acordo sobre os objetivos mínimos adequados a uma terapêutica de substituição ideal com vitamina D.

Para a realização do doseamento dos níveis séricos da vitamina D pode recorrer-se a diversos métodos: ensaios de ligação às proteínas competitivas (CPBA), imunoensaios e técnicas cromatográficas, designadamente, cromatografia líquida (LC) associada a espetrometria de massa (LC-MS/MS) (Alves *et al.*, 2013).

Ao longo dos anos a avaliação laboratorial deste composto revelou diversos problemas, devido essencialmente à grande diversidade de métodos e resultados obtidos entre os diferentes laboratórios (Alves *et al.*, 2013). Esta situação tornou-se num fator preponderante tendo ao longo dos tempos sido realizados esforços contínuos com vista à melhoria dos ensaios laboratoriais e à diminuição da variabilidade existente entre eles (Alves *et al.*, 2013).

Como referido anteriormente, a vitamina D pode estar presente no organismo humano sob diversas formas. No entanto, nem todas elas são igualmente viáveis para este processo de se obter um valor de teor corporal mais fidedigno desta vitamina. Apesar de se poder supor que a determinação da forma ativa desta vitamina, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, seria a que daria uma informação mais correta do teor corporal na vitamina, a sua avaliação quantitativa não é a mais indicada para este efeito dado que mesmo em situações de défice

os níveis da forma ativa podem estar elevados (Alves *et al.*, 2013; Binkley *et al.*, 2010; Fraser & Milan, 2013). Quando um déficit de vitamina D se verifica, ocorre uma elevação dos níveis de PTH, que conduz a um aumento da atividade a nível renal da 1α -hidroxilase, promovendo desta forma a conversão da 25(OH)D em 1,25(OH) $_2$ D (Alves *et al.*, 2010; Binkley *et al.*, 2010). Como no organismo humano se verificam concentrações mais elevadas de 25(OH)D (30 ng/ml) do que de 1,25(OH) $_2$ D, com o aumento da conversão, níveis elevados da forma ativa podem ser verificados mesmo em situações de déficit (Alves *et al.*, 2013; Binkley *et al.*, 2010).

Assim, a avaliação do nível sérico, de 25(OH)D é admitida, de forma consensual, como sendo o melhor indicador do teor corporal de vitamina D no organismo humano (Beastall & Rainbow, 2008; Seamans & Cashman., 2009). Esta situação é justificada porque os níveis desta forma de vitamina D no organismo humano reflete não só a vitamina D obtida da dieta e da exposição solar, mas também a que resulta da conversão de vitamina D a partir dos depósitos adiposos presentes no fígado (Beastall & Rainbow, 2008; Seamans & Cashman., 2009). Adicionalmente as concentrações de 1,25(OH) $_2$ D são extremamente baixas, tem uma semi-vida curta (aproximadamente 24 h enquanto a 25-hidroxivitamina D apresenta uma semi-vida de cerca de 3 semanas) e os níveis dependem de exposição à luz solar e ingestão de vitamina D recentes (Baecher *et al.*, 2012; Wootton, 2005). No entanto, apesar de não ser um bom indicador dos níveis corporais de vitamina D o 1,25(OH) $_2$ D apresenta também valor clínico e é muitas vezes quantificado utilizando métodos semelhantes aos utilizados para a 25(OH)D (Fraser & Milan, 2013).

8.1.Doseamento dos níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH) $_2$ D

A grande variabilidade de resultados obtidos no doseamento de 25(OH)D por diversos métodos de quantificação leva a que a sua avaliação seja um desafio.

Os métodos mais antigos de doseamento de 25(OH)D, no soro ou em outros fluídos corporais, baseavam-se em ensaios de ligação competitiva às proteínas ou imunoensaios para medição destes metabolitos (Alves *et al.*, 2013; Fraser & Milan, 2013; Wallace *et al.*, 2010).

Os primeiros ensaios de ligação às proteínas competitivas (CPBA) para determinação dos níveis de 25(OH)D circulantes foram realizados há mais de 4 décadas (em 1970), pelo Dr. John Haddad Jr., e baseavam-se na utilização da proteína de ligação

da vitamina D (DBP) como agente de ligação e marcador do composto 3H-25(OH)D (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Apesar de válido este método era relativamente complicado, essencialmente devido à necessidade de extração orgânica, secagem utilizando azoto e realização de cromatografia preparativa antes da realização do ensaio (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Neste sentido, apesar da utilização do método de Haddad ser útil em laboratórios de pesquisa, este não apresentava os requisitos necessários para satisfazer as necessidades de laboratórios de análises clínicas de alto rendimento (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010).

No sentido de contornar esta situação, foi desenvolvida uma segunda geração de ensaios de ligação às proteínas competitivas para a determinação de 25(OH)D, que visavam a eliminação da cromatografia preparativa da amostra (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). No entanto, estes ensaios não conseguiram os resultados pretendidos, verificando-se reações cruzadas com vários metabolitos de 25(OH)D e instabilidade das preparações da proteína de ligação (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Exemplo de um destes ensaios foi o método desenvolvido por Belsey *et al.* (em 1974) que não foi validado, devido a problemas de matriz de amostra proveniente de extração etanólica, que apenas podiam ser eliminados com realização de cromatografia de purificação da amostra (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Estes efeitos de matriz são extremamente importantes dado que alteram a capacidade do agente de ligação, do anticorpo ou da proteína de se associar a 25(OH)D verificando-se, por consequência, uma diminuição significativa da validade do ensaio. Estudos existentes revelam que a DBP é mais sensível a estes efeitos de matriz do que os anticorpos (Fraser & Milan 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010)

Outro fator que condicionou, e condiciona, muito a utilização destes métodos é a necessidade de uma etapa prévia de extração por solvente cujo objetivo é remover os esteróis das proteínas de ligação (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Este procedimento, foi sendo substituído, passando a utilizar-se agentes bloqueadores desses esteróis de forma a facilitar a inclusão de 25(OH)D. No entanto, no decorrer da prática clínica verificou-se que aplicação desta abordagem designada de “*block and displace*” era limitada, uma vez que conduzia a valores

extremamente elevados de 25(OH)D (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010).

Para além dos condicionalismos descritos, a medição de 25(OH)D é também muito influenciada pelas características próprias deste metabolito que é extremamente hidrofóbico, possui duas isoformas e apresenta uma elevada instabilidade aquosa. Em paralelo, a elevada lipofilia deste composto contribui também para uma maior ocorrência de efeito matriz (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010).

Desta forma, mesmo após longos anos de pesquisa, não foi possível ultrapassar as dificuldades inerentes a este tipo de ensaios pelo que utilização atual de ensaios de CPBA para o doseamento de 25 (OH) D é rara (Fraser & Milan, 2013; Wallace *et al.*, 2010).

Em meados de 1980 surgiram os primeiros imunoensaios para o doseamento de 25(OH)D que pretendiam ultrapassar as limitações inerentes ao método anteriormente descrito (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). O primeiro imunoensaio, mais precisamente um radioimunoensaio (RIA) não cromatográfico incluiu um anticorpo específico para as duas isoformas de 25(OH)D (25(OH)D₂ e 25(OH)D₃) e como marcador o 125I-25(OH)D, tornando este imunoensaio num ensaio com maior rendimento e desempenho do que o anterior (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Permitiu definir o padrão para o diagnóstico clínico da deficiência nutricional de vitamina D sendo atualmente utilizado num grande número de estudos que pretendem correlacionar esta deficiência com o risco de desenvolvimento de outras doenças (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010).

O doseamento do conteúdo corporal de 25(OH)D baseia-se na medição dos níveis totais de 25(OH)D, ou seja a soma dos níveis de 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃ (Fraser & Milan, 2013). Ao nível dos imunoensaios a necessidade de deteção de ambas as formas contribui para a complexidade deste tipo de testes (Fraser & Milan, 2013). Diferenças no reconhecimento destes metabolitos podem levar à sobre ou subestimativa dos níveis de 25(OH)D (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). Esta situação verifica-se devido à existência de imunoensaios equipotentes na medição de 25 (OH)D₂ e 25 (OH)D₃, e outros de detetam de forma específica uma destas isoformas (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). Neste sentido, dado que não se pretende obter níveis isolados dos metabolitos mas sim o seu total, esta situação apresenta-se como um problema

inerente a estes métodos, podendo levar a ocorrência de erros de interpretação e de classificação clínica de alguns imunoensaios (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008).

Para além da situação anterior, dois processos cruciais dos imunoensaios e que revelam outras das limitações deste tipo de métodos são a necessidade de realização de uma extração prévia solvente para remover os esterois das proteínas de ligação, semelhante à realizada no método anterior, seguida de uma separação cromatográfica (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). No sentido de eliminar estes procedimentos têm vindo a ser desenvolvidos imunoensaios para 25 (OH)D nos quais foram substituídos estes procedimentos, através da incorporação agentes de bloqueio que deslocam 25 (OH)D da sua DBP (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008).. Esta nova abordagem facilita em muito a automatização. Contudo dados recentes sugerem que alguns imunoensaios que utilizam esta técnica podem ser afetados por variações nas concentrações de DBP, provavelmente devido ao deslocamento variável de 25 (OH)D da DBP e, em determinados indivíduos pode dever-se a um aumento da afinidade de 25 (OH)D para determinadas variantes da DBP, resultando em variações acentuadas nos resultados obtidos (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008).

Atualmente, os imunoensaios apresentam-se como os métodos mais comuns no doseamento de 25 (OH)D, existindo disponíveis uma grande diversidade de imunoensaios tendo por base várias metodologias, destacando-se os que utilizam substâncias quimioluminescentes e os radioimunoensaios (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). Alguns ensaios utilizando ELISA estão também disponíveis (Fraser & Milan, 2013)

Com o decorrer dos anos, para ultrapassar problemas relacionados com o uso de radioatividade, bem como a conservação limitada inerente aos marcadores radioativos, estes têm vindo a ser progressivamente substituídos por imunoensaios que utilizam substâncias quimioluminescentes ou enzimas (Alves *et al.*, 2013; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Com o aumento das solicitações para dosagem de 25 (OH)D, as técnicas manuais foram progressivamente substituídas por métodos incorporados a plataformas automatizadas, como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), quimioluminescência e eletroquimioluminescência (Alves *et al.*, 2013; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010).. De entre estes métodos o que têm vindo

a ser incorporado em mais testes automatizados é a quimiluminescência existindo no mercado uma série de testes disponíveis com esta metodologia (ex.: Diasorin Liaison) (Alves *et al.*, 2013; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008). Os imunoenaios que utilizam substâncias quimioluminescentes são ensaios diretos, competitivos e que se baseiam na determinação quantitativa da 25(OH)D (Alves *et al.*, 2013; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008). Nestes testes é utilizado um anticorpo específico (anti-vitamina D) que têm como função revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e a vitamina D encontra-se ligada a um derivado de isoluminol (Alves *et al.*, 2013; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008). A 25(OH)D é desassociada da proteína de ligação e compete com a vitamina D pelos locais de ligação do anticorpo durante a incubação (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). O material não ligado é removido com um ciclo de lavagem depois da incubação (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). Os reagentes iniciadores são então adicionados para induzir uma reação de quimioluminescência (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). O sinal luminoso é medido e é inversamente proporcional à concentração de 25(OH)D existente nos calibradores, controlos ou amostras (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008).

Apesar dos métodos quimioluminescentes, eletroquimioluminescentes e ELISA serem extremamente úteis, estes apresentam algumas desvantagens dentro das quais se destaca a maior suscetibilidade a interferentes e uma maior imprecisão (variabilidade entre os ensaios) (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). Por outro lado, esses ensaios podem ser facilmente automatizados, apresentando grande capacidade produtiva, reduzindo os custos e o tempo para realização da dosagem (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008). Por este motivo, este tipo de ensaios têm sido frequentemente adotados em grandes estudos populacionais e na rotina dos laboratórios clínicos, apesar do aumento da utilização de métodos de deteção direta nos últimos anos (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007; Hollis, 2008).

Apesar da utilização frequente de imunoenaios no doseamento de 25(OH)D, os métodos diretos de deteção apresentam-se como ensaios mais fidedignos. Os métodos diretos de deteção de 25(OH)D (Tabela V) incluem normalmente HPLC, sendo o método mais comum HPLC de fase reversa associado à deteção UV com eluição isocrática ou em gradiente, e cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Alguns métodos utilizando

cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS) também foram descritos, mas em muito menor número (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010)..

Os métodos de HPLC permitem separar e quantificar individualmente os dois principais metabolitos de 25(OH)D circulantes, ou seja, 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃ (Baecher *et al.*, 2012; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). A realização de HPLC seguido por detecção de UV, normalmente a um comprimento de onda de 265 nm, é uma técnica altamente repetível e, em geral, é considerada como a técnica padrão na detecção destes compostos Baecher *et al.*, 2012; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010; van den Ouweland *et al.*, 2010). Apesar de ser considerada uma técnica de eleição, esta apresenta inúmeras limitações (Tabela V) que por vezes limitam a sua utilização Baecher *et al.*, 2012; Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010). Estes métodos requerem um volume de amostra relativamente grande, bem como um padrão interno de natureza radioativa. Além disso, possuem um baixo ritmo de amostragem e necessitam de ser executados por técnico experientes para se obter resultados precisos. Assim, este método não é considerado adequado para um laboratório clínico de alta capacidade (Fraser & Milan, 2013).

A LC-MS/MS constitui uma alternativa viável ao HPLC na avaliação de 25 (OH)D em circulação (Wallace *et al.*, 2010; Fraser & Milan, 2013). É descrita como uma técnica altamente sensível e considerada o método método de eleição na detecção e quantificação de 25 (OH) D (Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010; Fraser & Milan, 2013). Tal como no HPLC, permite quantificar separadamente as duas isoformas da vitamina 25 (OH)D, é um método preciso, sendo comparável com a técnica de radioimunoensaio (Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010; Fraser & Milan, 2013). No entanto, são necessários alguns procedimentos adicionais entre os quais se destaca a derivatização e/ou recurso a padrões internos e o equipamento tem um elevado custo (Hollis, 2008; Wallace *et al.*, 2010; Fraser & Milan, 2013). Um problema adicional do LC-MS/MS é a relativa incapacidade de discriminar 25 (OH)D₃ e o seu epímero inativo 3-epi-hidroxivitamina D₃ (3-epi-25 (OH)D₃) (Hollis, 2008; Saenger *et al.*, 2006; Wallace *et al.*, 2010; Fraser & Milan, 2013). Um epímero é uma molécula que difere de outra na configuração de um átomo, apesar de possuir massa idêntica e características cromatográficas semelhantes (Fraser & Milan, 2013). Desta forma, a presença de 3-epi-25 (OH)D₃ pode aumentar a concentração de 25-

(OH)D total, conduzindo a valores sobrestimados deste composto (Fraser & Milan, 2013). Esta situação é relevante e têm merecido alguma preocupação, uma vez que, dada a natureza aquiral destes métodos este não pode ser separado do 25 (OH)D, através da maioria dos métodos utilizados, e segundo dados recentes, este epímero está presente em 99% das amostras testadas (Fraser & Milan, 2013).

Tabela V- Métodos diretos de detecção de 25-hidroxivitamina D: vantagens e limitações (adaptado de Fraser & Milan, 2013; Wallace *et al.*, 2010).

Métodos Diretos de Detecção do 25-hidroxivitamina D		
Método	Vantagens	Limitações
HPLC-UV	<ul style="list-style-type: none"> - Extração por solventes ou extração em fase sólida seguida por cromatografia minimiza os efeitos da matriz e interferências; - Processo pode ser automático ou semi-automático; - Medição simultânea e separadamente de 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃; - Operador capaz de controlar a padronização; - Baixo custo dos reagentes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer pessoal especializado; - Alguns procedimentos necessitam de grandes volumes de amostra; - Baixo ritmo de amostragem - Tempo de resposta relativamente mais longo em comparação com imunoensaios; - Possível interferência de epímero C3-25(OH)D.
LC – MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Extração por solventes ou extração em fase sólida seguida por cromatografia minimiza os efeitos da matriz e interferências; - Processo pode ser automático ou semi-automático; - Medição simultânea e separadamente de 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃; - O operador pode controlar a padronização; - Altamente exato e preciso quando devidamente validado. 	<ul style="list-style-type: none"> - O equipamento é caro; - Requer pessoal especializado; - Reduzido ritmo de amostragem - Tempo de resposta relativamente mais longo em comparação com imunoensaios; - Suscetível a interferência de supressão por iões; - Possível interferência de epímero C3-25(OH)D.

Paralelamente à quantificação do 25 (OH)D, a quantificação de 1,25 (OH)₂D é, também, em alguns casos relevante (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007). A quantificação deste metabolito apresenta-se como um dos maiores desafios no que respeita à quantificação dos diversos metabolitos da vitamina D (Fraser & Milan, 2013; Hollis,

2007). Conforme referido, este composto circula em concentrações cerca de mil vezes menores que o seu precursor, 25 (OH)D (na ordem dos picomolares enquanto que a 25-hidroxivitamina D tem níveis na ordem dos nanomolares) e é altamente lipofílico nanomolares (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007). Neste sentido, o desenvolvimento de um ensaio simples e rápido para a sua quantificação têm sido uma tarefa complicada (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007). Os métodos disponíveis para o doseamento deste metabolito baseiam-se em processos preparativos complexos e na determinação por ensaios competitivos baseados em recetores ou anticorpos específicos (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007). O elevado custo e grande complexidade metodológica da dosagem de 1,25 (OH)₂D associado à restrita importância diagnóstica deste metabolito justificam a reduzida disponibilidade do procedimento (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007). Estudos recentes, revelam que os métodos de doseamento de 1,25 (OH)₂D mais comuns são os imunoensaios, em particular radioimunoensaios, seguidos dos ensaios utilizando LC –MS/MS (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007). Métodos tendo por base HPLC não podem ser adaptados para dosear este metabolito pois a sua reduzida concentração dificulta a quantificação por métodos diretos de deteção por UV (Fraser & Milan, 2013; Hollis, 2007).

9. Toxicidade e Hipersensibilidade à vitamina D

Apesar de quando administrada em doses adequadas a vitamina D não apresentar qualquer tipo de toxicidade, se ingerida em quantidades elevadas, pode ser tóxica. A ingestão por adultos de doses de vitamina D na ordem dos 50000 UI leva ao desenvolvimento de sintomas de toxicidade, nomeadamente, anorexia, desidratação, fraqueza muscular, enxaquecas, náuseas, vômitos, poliúria, e polidipsia (Cannell *et al.*, 2008; Wimalawansa, 2012).

A hipervitaminose, ou seja, o excesso de vitamina D, acontece devido a um excesso de suplementação com vitamina D, e não devido ao consumo de alimentos ou exposição ilimitada ao sol (Cannell *et al.*, 2008; Wimalawansa, 2012). Neste último caso, com a exposição ilimitada, produz-se bronzeado, que age como um filtro de UV, prevenindo a conversão do 7-deidrocolesterol em colecalciferol (Cannell *et al.*, 2008; Wimalawansa, 2012).

A toxicidade advinda da ingestão excessiva de vitamina D está associada aos efeitos das elevadas concentrações em 25 (OH)D e não da forma ativa da vitamina D já que, apesar dos valores de concentração da 25-hidroxivitamina D serem elevados aquando da toma excessiva de vitamina D, o nível do 1,25 (OH)₂ D não sofre um aumento abrupto (Cannell *et al.*, 2008; Wimalawansa, 2012).

Ao nível da hipersensibilidade à vitamina D, o caso mais comum deste tipo de situação é o hiperparatiroidismo primário, que se encontra associado a uma promoção da reabsorção óssea e a absorção intestinal de cálcio (Cannell *et al.*, 2008; Wimalawansa, 2012).. Em indivíduos que se encontrem nesta situação clínica, a ingestão de vitamina D aumenta a hipercalcemia, situação que se verifica devido a ligação que ocorre entre ingestão de vitamina D e a produção de 1,25 (OH)₂ D (Bell, 1998; Cannell *et al.*, 2008; Wimalawansa, 2012). Nos casos em que se verifica a presença de hipercalcemia, por exemplo em indivíduos com tuberculose ou linfoma devido a ingestão de vitamina D, é recomendado reduzir ou mesmo eliminar qualquer tipo de fonte dietética, ou de outro tipo, de vitamina D (Bell, 1998; Cannell *et al.*, 2008; Wimalawansa, 2012).

10. Recomendações atuais de vitamina D

Em 2011, a *Endocrine Society* elaborou uma série de recomendações acerca da vitamina D, que foram divididas em 4 grupos:

- i. Procedimento Diagnóstico
- ii. Recomendações dietéticas de ingestão de vitamina D para indivíduos em risco de deficiência de vitamina D
- iii. Estratégias de tratamento e prevenção
- iv. Benefícios não calcémicos da vitamina D (Alves *et al.*, 2013; Holick *et al.*, 2011).

10.1.Procedimento Diagnóstico

Ao nível do rastreio/diagnóstico dos níveis de vitamina D séricos, as orientações recomendam apenas que este seja realizado em indivíduos em risco de desenvolver deficiência em vitamina D e não na população em geral.

Na realização destes testes de diagnóstico, recomenda-se a medição dos níveis séricos de 25 (OH)D circulante, dado que é o composto que melhor informação disponibiliza. A presença de uma deficiência em vitamina D é definida se se verificarem níveis de 25 (OH)D inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L). Não é recomendado o doseamento dos níveis séricos de 1,25 (OH)₂ de forma rotineira. A realização deste procedimento é importante apenas para a monitorização de determinadas patologias, nomeadamente, doenças congénitas e adquiridas ao nível do metabolismo da vitamina D e fosfato.

10.2.Recomendações dietéticas de ingestão de vitamina D para indivíduos em risco de deficiência de vitamina D

Para indivíduos descritos como de risco para o desenvolvimento de deficiência de vitamina D, as orientações são para a ingestão de vitamina D através da dieta (Tabela VI).

As crianças com menos de 1 anos de idade devem receber no mínimo 400 UI/dia, o equivalente a 10000 ng/dia de vitamina D. Para crianças com idade superior a 1 ano, as doses devem ser elevadas para a ordem dos 600 UI/dia, de forma a maximizar a saúde e/ou desenvolvimento ósseo. As doses pediátricas referenciadas anteriormente ainda não têm a sua eficácia ao nível da promoção e maximização dos seus benefícios sobre da musculatura esquelética e formação óssea, totalmente conhecida. No entanto, para que se consigam manter níveis de vitamina D séricos acima de 30 ng/mL, pode ser necessário a ingestão de uma quantidade mínima na ordem das 1000 UI/dia.

Tabela VI – Indicações para a ingestão de vitamina D em indivíduos de risco sugeridas pela *Endocrine Society* (adaptado de Alves *et al.*, 2013; Holick *et al.*, 2011).

Grupo de indivíduos	Dose diária mínima recomendada (UI)	Dose diária necessária para 25 (OH)D >30 ng/mL
<1 ano	400	1000
1-18 anos	600	1000
19-50 anos	600	1500-2000
50-70 anos	600	1500-2000
>70 anos	800	1500-2000
Grávidas/mulheres em fase de amamentação	>600 /1400-1500 ou 4000-6000 (se amamentação exclusiva com leite materno)	1500-2000

Crianças e adultos obesos ou a utilizar anticonvulsivantes, glicocorticoides, antifúngicos ou antivirais (SIDA)	2 a 3 vezes maiores as recomendadas para cada faixa etária	2 a 3 vezes maiores as recomendadas para cada faixa etária
--	--	--

Nos adultos entre os 19-50 anos, as recomendações existentes indicam que se deva ingerir no mínimo 600 UI por dia, no sentido de promover um potencial benefício, mas não ao nível do sistema músculo-esquelético. No entanto, de forma a manterem-se e /ou elevarem-se os níveis de vitamina D acima de 30 ng/mL, podem ser necessárias doses entre 1500 a 2000 UI/dia. Para adultos com idades entre os 50 e 70 anos, as recomendações existentes indicam que se deva ingerir por dia no mínimo 600 UI, subindo para valores acima de 800 UI/dia para adultos com idade superiores a 70 anos. No entanto, para aumentar o nível sanguíneo de 25(OH)D acima de 30 ng/ml podem ser necessárias doses entre 1500 a 2000 UI/dia.

Em mulheres grávidas recomenda-se uma dose diária de vitamina D de no mínimo de 600 UI/dia, no entanto o ideal é que os valores sejam mais elevados, uma vez que doses diárias de 600 UI não suficientes para prevenir a deficiência de vitamina D em mulheres grávidas. Para elevar os níveis de 25(OH)D acima dos 30 ng/mL podem sãor necessárias doses entre 1500 e 2000 UI/dia. Por outro lado, no caso de mulheres em fase de lactação, os valores tendem a ser superiores aos recomendados para as grávidas. Para satisfazer as exigências de um bebê que é alimentado apenas por leite materno, a mulher necessita de ingerir por dia doses de 4000 a 6000 UI de forma a transferir a quantidade suficiente de vitamina D no leite. Desta forma, no mínimo, as mulheres que amamentam podem precisar de ingerir por dia doses na ordem dos 1400-1500 UI, e para satisfazer a exigências do bebê, podem necessitara de doses de 4000-6000 IU, nos casos em que não seja dado a criança um suplemento de vitamina D.

Dois grupos de indivíduos que merecem algum destaque em termos de ingestão de vitamina D são crianças e adultos obesos e utilizadores de medicamentos anticonvulsivantes, glucocorticoides, antifúngicos e medicamentos para o tratamento do VIH. Para estes grupos recomenda-se a ingestão de doses 2 a 3 vezes superiores às definidas para a sua faixa etária, de forma a satisfazer as necessidades básicas diárias de vitamina D.

As recomendações existentes para cada faixa etária aconselham que as doses máximas de suplementação vitamina D indicadas (Tabela VII) nunca sejam excedidas, salvo recomendação médica, dado o risco de ocorrência de hipervitaminose ou outro tipo de toxicidade. Desta forma, as doses devem ser de 1000 UI/dia para crianças abaixo dos 6 meses. Entre os 6 meses e 1 ano de vida, a dose máxima indicada é de 1500 UI/dia e para crianças entre 1 e 3 anos de 2500 UI/dia. Para crianças entre 4 e 8 anos de idade, a dose é de 3000 UI/dia, e 4000 UI/dia para qualquer criança acima dos 8 anos de idade.

Tabela VII – Doses diárias máximas recomendadas pela *Endocrine Society* para cada faixa etária (adaptado de Alves *et al.*, 2013; Holick *et al.*, 2011)..

Faixa etária	Dose diária máxima indicada (UI)
0-6 meses	1000
6 meses – 1 ano	1500
1-3 anos	2500
4-8 anos	3000
> 8 anos	4000

10.3.Estratégias de Tratamento e Prevenção

Para o tratamento e prevenção da deficiência em vitamina D, as orientações da *Endocrine Society* recomendam a utilização de qualquer uma das isoformas de vitamina D.

Em crianças com idades entre 0-1 anos que apresentem uma deficiência em vitamina D recomenda-se que sejam tratadas com 2000 UI/dia de vitamina D₂ e D₃ ou, semanalmente por um período de seis semana até se atingir um nível sérico de 30 ng/ml, com 50000 UI, seguidas de doses entre 400 e 1000 UI/dia, para promover a manutenção dos níveis séricos. Indivíduos com idades entre 1 e 18 anos com deficiência de vitamina D devem ser tratados com 2000 UI/dia de vitamina D₂ e D₃ durante pelo menos 6 semanas, ou com 50000 UI por semana durante seis semanas consecutivas, seguida de uma fase manutenção para assegurar níveis acima de 30 ng/mL utilizando doses entre 600 e 1000 UI/dia.

Para adultos com deficiência em vitamina D recomenda-se o tratamento com 50000 UI uma vez por semana de vitamina D₂ e D₃ durante 8 semanas, ou o uso de uma dose equivalente diária de 6000 UI, seguida de uma dose de manutenção de 1500 a 2000 UI/dia.

No caso de indivíduos obesos, com síndrome de má absorção intestinal ou que usem medicamentos que afetam o metabolismo ósseo, indica-se a utilização de doses duas a três vezes superiores às indicadas para cada faixa etária, devendo no mínimo ingerir-se 6000 a 10000 UI/dia na fase de tratamento e 3000 a 6000 UI/dia na fase de manutenção.

Em indivíduos com deficiência de vitamina D que apresentam produção extra-renal 1,25(OH)₂ D, recomenda-se a monitorização dos níveis séricos de 25(OH)D e cálcio, durante o período de tratamento, de forma a prevenir o aparecimento de hipercalcemia. Outra situação que merece atenção são indivíduos com hiperparatireoidismo e deficiência de vitamina D, a quem se recomenda tratamento com vitamina D acompanhado de monitorização dos níveis séricos de cálcio ao longo do tratamento.

10.4. Benefícios não calcêmicos da vitamina D

Para que se verifiquem benefícios não calcêmicos da vitamina D, as orientações da *Endocrine Society*, recomendam a suplementação com vitamina D na prevenção de quedas em indivíduos considerados de risco. Por outro lado, na prevenção de DVC, mortalidade ou melhoria da qualidade de vida não se recomenda prescrever doses de vitamina D superiores as necessidades diárias.

IV – Conclusão

Ao longo do tempo, a importância da vitamina D ao nível das mais diversas funções biológicas tem vindo a ser extensamente estudada, e colocou em evidência a sua grande utilidade. Durante alguns anos, a importância de vitamina D restringiu-se às suas funções ao nível do metabolismo do cálcio, mais precisamente na manutenção dos níveis de cálcio sérico, através da promoção da absorção de cálcio e fósforo a partir do intestino e da reabsorção óssea de cálcio. No entanto, alguns estudos permitiram verificar que a vitamina D não era apenas uma vitamina, mas sim uma hormona, com um grande número de utilidades e associações com várias patologias e situações clínicas, além do metabolismo fosfocálcio já extensamente conhecido.

Os trabalhos realizados revelaram a importância da manutenção de níveis séricos deste composto, e em particular dos seus principais metabolitos, 25(OH)D e 1,25(OH)₂D, para a manutenção do estado saudável do indivíduo. Várias patologias, nomeadamente, cancro, diabetes, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla, distúrbios psiquiátricos, doença neuro-musculares, apresentam uma associação positiva com a presença de deficiência em vitamina D. Para além disso, ao nível destas mesmas patologias, a suplementação com vitamina D, ou seja a reposição dos níveis de vitamina D a níveis adequados, regista na maioria dos estudos um possível efeito preventivo no seu desenvolvimento.

Paralelamente as relações muito estreitas que têm sido estabelecidas entre o défice de vitamina D e o desenvolvimento de determinadas patologias, faz com que atualmente a deficiência em vitamina D seja encarada como um problema de saúde pública. Esta patologia afeta vários países da Europa e dos EUA, particularmente determinadas populações de risco, ou seja, indivíduos que possuem associados alguns fatores de risco descritos como potenciadores para o desenvolvimento de deficiência em vitamina D e a quem são aconselhados rastreios para o diagnóstico da doença. De entre estas populações de risco destacam-se os idosos, indivíduos institucionalizados, grávidas, mulheres a amamentar, mulheres pós-menopausa (maior risco de quedas) e indivíduos com reduzida exposição solar.

Assim, a medição exata dos níveis de vitamina D tem assumido elevada relevância na clínica. Para a avaliação dos níveis séricos de vitamina D no organismo são atualmente considerados os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) e de 1,25

dihidroxitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$). No entanto, a concentração de $25(\text{OH})\text{D}$ é o parâmetro de rotina para aferição dos níveis de vitamina D sendo o que melhor indicação fornece acerca da reserva de vitamina D, uma vez que fornece uma indicação da quantidade total disponível quer pela via da exposição solar, quer pela dieta.

Atualmente, os métodos mais exatos e precisos para o doseamento de $25(\text{OH})\text{D}$ são os baseados na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em sequência (LC-MS/MS). Na prática, porém, os imunoensaios automatizados são os métodos mais comumente utilizados pelos laboratórios clínicos. Por outro lado, o HPLC e a LC-MS/MS têm a capacidade de distinguir as duas formas de 25-hidroxitamina D ($25(\text{OH})\text{D}_2$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$), fornecendo resultados distintos para cada uma.

Por fim, é importante referir que apesar da existência de um número crescente de estudos acerca da vitamina D, alguns aspetos acerca da função que não no metabolismo fosfocálcio ainda carecem de esclarecimentos. Assim, as relações causais entre a presença de determinada patologia e o défice (ou excesso) de vitamina D necessitam de se alvo de estudos mais aprofundados, para que seja possível explicar mecanismos de atuação e se possam estabelecer critérios e limites mais precisos ao nível das concentrações ideais de vitamina D no organismo.

.

V – Referências Bibliográficas

- Abbas, S., Chang-Claude, J. & Linseisen, J. (2009). Plasma 25-hydroxyvitamin D and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *International Journal of Cancer*, 124 (1), pp.250-255.
- Abbas, S. *et al.* (2008). Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer—results of a large case-control study. *Carcinogenesis*, 29 (1), pp.93-99.
- Alves, M., *et al.* (2013). Vitamina D – importância da avaliação laboratorial. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 8 (1), pp.32-39.
- Annweiler, C. *et al.* (2010). Fall prevention and vitamin D in the elderly: an overview of the key role of the non-bone effects. *Journal of Neuro Engineering and Rehabilitation*, 7 (1), pp.50-50.
- Armas, L. A. G., Hollis, B. W. & Heaney, R. P. (2004). Vitamin D₂ Is Much Less Effective than Vitamin D₃ in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89 (11), pp.5387-5391.
- Arunabh, S. *et al.* (2003). Body Fat Content and 25-Hydroxyvitamin D Levels in Healthy Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88 (1), pp.157-161
- Arvold, D. *et al.* (2009). Correlation of Symptoms with Vitamin D Deficiency and Symptom Response to Cholecalciferol Treatment: A Randomized Controlled Trial. *Endocrine Practice*, 15 (3), pp.203-212.
- Baecher, S. *et al.* (2012). Simultaneous quantification of four vitamin D metabolites in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for vitamin D profiling. *Clinical Biochemistry*, 45 (16-17), pp.1491-1496.
- Ball, G. F. M. (1988). *Fat-soluble vitamin assays in food analysis: a comprehensive review*, Elsevier Applied Science.
- Ball, G. F. M. (2000). Fat-soluble vitamins. In: NOLLET, L. M. L. & DEKKER, M. (eds.) *Food analysis by HPLC*. 2^a ed.
- Barral, D., Barros, A. C. & Araújo, R. P. C. D. (2007). Vitamin D: A Molecular Approach. *Pesquisa Brasileira Odontopediatria Clínica Integrada*, 7 (3), pp.309-315.
- Baynes, J. W., E & Dominiczak, M. H. (2011). *Bioquímica Médica*. 3 ed., Elsevier.

- Beastall, G., E & Rainbow, S. (2008). Vitamin D Reinvented: Implications for Clinical Chemistry. *Clinical Chemistry*, 54 (4), pp.630-632.
- Bell, N. H. (1998). Renal and Nonrenal 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylases and Their Clinical Significance. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13 (3), pp.350-353.
- Bell, N. H. *et al.* (1985). Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 76 (1), pp.370-373.
- Binkley, N., Ramamurthy, R. & Krueger, D. (2010). Low Vitamin D Status: Definition, Prevalence, Consequences, and Correction. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39 (2), pp.287-301.
- Bischoff, H. A. *et al.* (2003). Effects of Vitamin D and Calcium Supplementation on Falls: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18 (2), pp.343-351.
- Bischoff-Ferrari, H. A. *et al.* (2004). Effect of vitamin d on falls: A meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 291 (16), pp.1999-2006.
- Bischoff-Ferrari, H. A. *et al.* (2009). Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *British Medical Journal*, 339, pp.b3692.
- Bolland, M. J. *et al.* (2008). Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. *British Medical Journal*, 336, pp.262
- Bosomworth, N. J. (2011). Mitigating epidemic vitamin D deficiency: The agony of evidence. *Canadian Family Physician*, 57 (1), pp.16-20.
- Brum, D. G. *et al.* (2014). Supplementation and therapeutic use of vitamin D in patients with multiple sclerosis: Consensus of the Scientific Department of Neuroimmunology of the Brazilian Academy of Neurology. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 72 (2), pp.152-156.
- Caan, B. *et al.* (2007). Calcium plus vitamin d supplementation and the risk of postmenopausal weight gain. *Archives of Internal Medicine*, 167 (9), pp.893-902.
- Calvo, M. S., Whiting, S. J. & Barton, C. N. (2004). Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (suppl 6), pp.1710S-1716S.

- Cannell, J. *et al.* (2008). Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9 (1), pp.107-118.
- Carpenter, K. J. & Zhao, L. (1999). Forgotten Mysteries in the Early History of Vitamin D. *The Journal of Nutrition*, 129 (5), pp.923-927.
- Chen, P. *et al.* (2010). Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121 (2), pp.469-477.
- Chung, M. *et al.* (2011). Vitamin D With or Without Calcium Supplementation for Prevention of Cancer and Fractures: An Updated Meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 155 (12), pp.827-838.
- Crew, K. D. *et al.* (2009). Association between Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Breast Cancer Risk. *Cancer Prevention Research*, 2 (6), pp.598-604.
- Dawson-Hughes, B. *et al.* (1997). Effect of Calcium and Vitamin D Supplementation on Bone Density in Men and Women 65 Years of Age or Older. *New England Journal of Medicine*, 337 (10), pp.670-676.
- Deeb, K. K., Trump, D. L. & Johnson, C. S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 7 (9), pp.684-700.
- Deluca, H. F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (suppl 6), pp.1689S-1696S.
- Deluca, H. F. & Shnoes, H. K. (1983). Vitamin D: Recent Advances. *Annual Review of Biochemistry*, 52, pp.411-439.
- Dharmarajan, T. S. *et al.* (2005). Vitamin D Deficiency in Community Older Adults with Falls of Gait Imbalance. *Journal of Nutrition For the Elderly*, 25 (1), pp.7-19.
- Dixon, K. M., E & Mason, R. S. (2009). Vitamin D. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41 (5), pp.982-985.
- Dobnig, H. *et al.* (2008). Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of Internal Medicine*, 168 (12), pp.1340-1349.
- Dusso, A. S., Brown, A. J. & Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 289 (1), pp.F8-28.

- Engel, P. *et al.* (2010). Serum 25(OH) Vitamin D and Risk of Breast Cancer: A Nested Case-Control Study from the French E3N Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19 (9), pp.2341-2350.
- Ertugrul, D. T. *et al.* (2011). STATIN-D Study: Comparison of the Influences of Rosuvastatin and Fluvastatin Treatment on the Levels of 25 Hydroxyvitamin D. *Cardiovascular Therapeutics*, 29 (2), pp.146-152.
- Feldman, D. *et al.* (2014). The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews Cancer*, 14 (2014), pp.342-357.
- Ferreira, F. 2005. *Nutrição Humana*, Lisboa Fundação Calouste Gulbenkian.
- Flicker, L. *et al.* (2003). Serum Vitamin D and Falls in Older Women in Residential Care in Australia. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51 (11), pp.1533-1538.
- Forman, J. P., Curhan, G. C. & Taylor, E. N. (2008). Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Incident Hypertension Among Young Women. *Hypertension*, 52 (5), pp.828-832.
- Forman, J. P. *et al.* (2007). Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Incident Hypertension. *Hypertension*, 49 (5), 1063-1069.
- Forouhi, N. G. *et al.* (2008). Baseline Serum 25-Hydroxy Vitamin D Is Predictive of Future Glycemic Status and Insulin Resistance: The Medical Research Council Ely Prospective Study 1990–2000. *Diabetes*, 57 (10), pp.2619-2625.
- Fraser, W. D., E & Milan, A. M. (2013). Vitamin D Assays: Past and Present Debates, Difficulties, and Developments. *Calcified Tissue International*, 92 (2), pp.118-127.
- Garland, C. F. *et al.* (2007). Vitamin D and prevention of breast cancer: Pooled analysis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103 (3-5), pp.708-711.
- Gepner, A. D. *et al.* (2012). A Prospective Randomized Controlled Trial of the Effects of Vitamin D Supplementation on Cardiovascular Disease Risk. *PLoS ONE*, 7 (5), pp.e36617.
- Gilchrest, B. A. (2008). Sun exposure and vitamin D sufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88 (2), pp.570S-577S.

- Ginde, A. A., Liu, M. C. & Camargo, C. A. (2009). Demographic Differences and Trends of Vitamin D Insufficiency in the US Population, 1988–2004. *Archives of Internal Medicine*, 169 (6), pp.626-632.
- Giovannucci, E. *et al.* (2008). A Prospective Study of 25-Hydroxy-Vitamin D and Risk of Myocardial Infarction in Men. *Archives of internal medicine*, 168 (11), pp.1174-1180.
- Goldberg, P., Fleming, M. C. & Picard, E. H. (1986). Multiple sclerosis: Decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Medical Hypotheses*, 21 (2), pp.193-200.
- Goldstein, D. (2009). The Epidemic of Vitamin D Deficiency. *Journal of Pediatric Nursing: Nursing Care of Children and Families*, 24 (4), pp.345-346.
- Grady, L. T., E & Thakker, K. D. (1980). Stability of solid drugs: Degradation of ergocalciferol (vitamin D₂) and cholecalciferol (vitamin D₃) at high humidities and elevated temperatures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69 (9), pp.1099-1102.
- Hathcock, J. N. *et al.* (2007). Risk assessment for vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85 (1), pp.6-18.
- Helzlsouer, K. J. *et al.* (2010). Overview of the Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *American Journal of Epidemiology*, 172 (1), pp.4-9.
- Holden, J. M., E & Lemar, L. E. (2008). Assessing vitamin D contents in foods and supplements: challenges and needs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88 (2), pp.551S-553S.
- Holick, M. F. (1981). The Cutaneous Photosynthesis of Previtamin D₃: A Unique Photoendocrine System. *Journal of Investigation of Dermatology*, 77 (1), pp.51-58.
- Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (suppl 6), pp.1678S-1688S.
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357, pp.266-281.
- Holick, M. F. *et al.* (2011). Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96 (7), pp.1911-1930.

- Hollis, B. W. (2007). Assessment of Circulating 25(OH)D and 1,25(OH)₂D: Emergence as Clinically Important Diagnostic Tools. *Nutrition Reviews*, 65 (8 pt 2), pp. S87-S90.
- Hollis, B. W. (2008). Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88 (2), pp.507S-510S.
- Hosseini-Nezhad, A., E & Holick, M. F. (2013). Vitamin D for Health: A Global Perspective. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 88 (7), pp.720-755.
- Hsia, J. *et al.* (2007). Calcium/Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Events. *Circulation*, 115 (7), pp.846-854.
- Hypponen, E. *et al.* (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *The Lancet*, 358 (9292), pp.1500-1503.
- INTERSALT (1988). Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *British Medical Journal*, 297 (6644), pp.319-328.
- Jakobsen, J., E & Saxholt, E. (2009). Vitamin D metabolites in bovine milk and butter. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (5), pp.472-478.
- James, E. *et al.* (2013). The effect of vitamin D-related interventions on multiple sclerosis relapses: a meta-analysis. *Multiple Sclerosis Journal*, 19 (12), pp.1571-1579.
- James, W. P. T. (2008). *22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D*.
- Janssen, H. C., Samson, M. M. & Verhaar, H. J. (2002). Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75 (4), pp.611-615.
- Javorsky, B. R. *et al.* (2006). Vitamin D Deficiency in Gastrointestinal Disease. *Practical Gastroenterology*, pp.52-72.
- Jenab, M. *et al.* (2010). Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *British Medical Journal*, 340, pp.b5500.
- Kampam, M. T. *et al.* (2012). Effect of vitamin D3 supplementation on relapses, disease progression, and measures of function in persons with multiple sclerosis: exploratory outcomes from a double-blind randomised controlled trial. *Multiple Sclerosis Journal*, 18 (8), pp.1144-1151.

- Kauffman, J. M. (2009). Benefits of Vitamin D Supplementation. *Journal of American Physicians and Surgeons*, 14 (2), pp.38-45.
- Kawase, T. *et al.* (2010). Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. *Cancer Science*, 101 (5), pp.1234-1240.
- Kayaniyil, S. *et al.* (2011). Prospective Associations of Vitamin D With β -Cell Function and Glycemia: The Prospective Metabolism and Islet cell Evaluation (PROMISE) Cohort Study. *Diabetes*, 60 (11), pp.2947-2953.
- Khan, H. *et al.* (2013). Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72, pp.89-97.
- Kim, Y., E & Je, Y. (2014). Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 110, pp.2772-2784.
- Kimball, S., Fuleihan, G. E.-H. & Vieth, R. (2008). Vitamin D: A Growing Perspective. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 45 (4), pp.339-414.
- Kimmons, J. E. *et al.* (2006). Associations Between Body Mass Index and the Prevalence of Low Micronutrient Levels Among US Adults. *Medscape General Medicine*, 8 (4), pp.59-59.
- Kimura, Y. *et al.* (1999). Effectiveness of 1, 25-dihydroxyvitamin D Supplementation on Blood Pressure Reduction in a Pseudohypoparathyroidism Patient with High Renin Activity. *Internal Medicine*, 38 (1), pp.31-35.
- Kragt, J. *et al.* (2009). Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Multiple Sclerosis*, 15 (1), pp.9-15.
- Krause, R. *et al.* (1998). Ultraviolet B and blood pressure. *The Lancet*, 352 (9129), pp. 709-710.
- Kristal-Boneh, E. *et al.* (1997). Association of Calcitriol and Blood Pressure in Normotensive Men. *Hypertension*, 30 (5), 1289-1294.
- Kumar, J. *et al.* (2009). Prevalence and Associations of 25-Hydroxyvitamin D Deficiency in US Children: NHANES 2001–2004. *Pediatrics*, 124 (3), pp. e362-e370.

- Lappe, J. M. *et al.* (2007). Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85 (6), pp. 1586-1591.
- Lee, J. E. *et al.* (2011). Circulating Levels of Vitamin D and Colon and Rectal Cancer: The Physicians' Health Study and a Meta-analysis of Prospective Studies. *Cancer Prevention Research*, 4 (5), pp. 735-743.
- Lemos, A. *et al.* (2007). Avaliação do comportamento dos anticorpos anti-citrulina e do factor reumatoide IgM na artrite reumatoide. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 32 (4), pp. 345-349.
- Leventis, P., E & Patel, S. (2008). Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 47 (11), pp. 1617-1621.
- Li, Y. C. *et al.* (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation*, 110 (2), pp. 229-238.
- Lichtenstein, A. *et al.* (2013). Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 59 (5), pp. 495-506.
- Lin, J. *et al.* (2007). Intakes of calcium and vitamin d and breast cancer risk in women. *Archives of Internal Medicine*, 167 (10), pp. 1050-1059.
- Lind, L., Wengle, B. O. & Ljunghall, S. (1987). Blood Pressure is Lowered by Vitamin D (Alphacalcidol) during Long-Term Treatment of Patients with Intermittent Hypercalcaemia. *Acta Medica Scandinavica*, 222 (5), pp. 423-427.
- Lips, P. (2001). Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in the Elderly: Consequences for Bone Loss and Fractures and Therapeutic Implications. *Endocrine Reviews*, 22 (4), pp. 477-501.
- Lips, P. *et al.* (2006). The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *Journal of Internal Medicine*, 260 (3), pp.245-254.
- Looker, A. C. *et al.* (2002). Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone*, 30 (5), pp. 771-777.

- Looker, A. C. *et al.* (2008). Serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population: 1988–1994 versus 2000–2004. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88 (6), pp. 1519-1527.
- Lowe, L. C. *et al.* (2005). Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *European Journal of Cancer*, 41 (8), pp. 1164-1169.
- Mahan, L. K., E & Escott-Stump, S. (2003). *Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy* Filadélfia, W.B. Saunders.
- Malabanan, A., Veronikis, I. E. & Holick, M. F. (1998). Redefining vitamin D insufficiency. *The Lancet*, 351 (9105), pp. 805-806.
- Manson, J. E., Mayne, S. T. & Clinton, S. K. (2011). Vitamin D and Prevention of Cancer — Ready for Prime Time? *New England Journal of Medicine*, 364 (15), pp. 1385-1387.
- Martinelli, V. *et al.* (2014). Vitamin D levels and risk of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Multiple Sclerosis Journal*, 20 (2), pp. 147-155.
- Martini, L. A., E & Wood, R. J. (2008). Vitamin D and blood pressure connection: update on epidemiologic, clinical, and mechanistic evidence. *Nutritional Reviews*, 66 (5), pp. 291-297.
- Martins, D. *et al.* (2007). Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin d in the United States: Data from the third national health and nutrition examination survey. *Archives of Internal Medicine*, 167 (11), pp. 1159-1165.
- Mcdowell, L. R. (1989). 3 - Vitamin D. In: Mcdowell, L. R. (ed.) *Vitamins in Animal Nutrition*. San Diego: Academic Press.
- Melamed, M. L. *et al.* (2008). 25-hydroxyl Vitamin D Levels and the Risk of Mortality in the General Population. *Archives of internal medicine*, 168 (15), pp. 1629-1637.
- Ministério da Agricultura (2010). Decreto-Lei nº 54, 28 de Maio 2010, Artigo 3, Anexo I.
- Mitri, J., Muraru, M. D. & Pittas, A. G. (2011). Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65 (9), pp. 1005-1015.
- Mosekilde, L. (2005). Vitamin D and the elderly. *Clinical Endocrinology*, 62 (3), pp. 265-281.

- Munger, K. L. *et al.* (2006). Serum 25-hydroxyvitamin d levels and risk of multiple sclerosis. *Journal of the American Medical Association*, 296 (23), pp. 2832-2838.
- Nadir, M. A., Szwejkowski, B. R. & Witham, M. D. (2010). Vitamin D and Cardiovascular Prevention. *Cardiovascular Therapeutics*, 28 (4), pp. e5-e12.
- Ni, Z., Smogorzewski, M. & Massry, S. G. (1994). Effects of parathyroid hormone on cytosolic calcium of rat adipocytes. *Endocrinology*, 135 (5), pp. 1837-1844.
- Organization Health Quality. (2010). Clinical Utility of Vitamin D Testing: An Evidence-Based Analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 10 (2), pp.1-93.
- Orwoll, E. *et al.* (2009). Vitamin D Deficiency in Older Men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94 (4), pp. 1214-1222.
- Ostermeyer, U., E & Schmidt, T. (2006). Vitamin D and provitamin D in fish. *European Food Research and Technology*, 222 (3), pp. 403-413.
- Palomer, X. *et al.* (2008). Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10 (3), pp. 185-197.
- Park, S. *et al.* (2015). Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency and increased risk of breast cancer among Korean women: a case-control study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 152 (1), pp. 147-154.
- Parker, J. *et al.* (2010). Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: Systematic review and meta-analysis. *Maturitas*, 65 (3), pp. 225-236.
- Pedrosa, M. A. C., E & Castro, M. L. (2005). Papel da vitamina D na função neuromuscular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 49 (4), pp. 495-502.
- Pereira, F., E & Almeida, M. (2008). Vitamina D: Uma verdadeira hormona. *Nutricias*, 8, pp. 42-47.
- Pfeifer, M. *et al.* (2000). Effects of a Short-Term Vitamin D and Calcium Supplementation on Body Sway and Secondary Hyperparathyroidism in Elderly Women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15 (6), pp. 1113-1118.
- Pfeifer, M. *et al.* (2001). Effects of a Short-Term Vitamin D3 and Calcium Supplementation on Blood Pressure and Parathyroid Hormone Levels in Elderly Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86 (4), pp. 1633-1637.

Pilz, S. *et al.* (2008a). Low Vitamin D Levels Predict Stroke in Patients Referred to Coronary Angiography. *Stroke*, 39, pp. 2611-2613.

Pilz, S. *et al.* (2008b). Association of Vitamin D Deficiency with Heart Failure and Sudden Cardiac Death in a Large Cross-Sectional Study of Patients Referred for Coronary Angiography. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93 (10), pp. 3927-3935.

Pittas, A. G. *et al.* (2006). Vitamin D and Calcium Intake in Relation to Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care*, 29 (3), pp. 650-656.

Pittas, A. G. *et al.* (2007). The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92 (6), pp. 2017-2029.

Pittas, A. G. *et al.* (2010a). Vitamin D and Cardiometabolic Outcomes: A Systematic Review. *Annals of internal medicine*, 152 (5), pp. 307-314.

Pittas, A. G. *et al.* (2010b). Plasma 25-Hydroxyvitamin D Concentration and Risk of Incident Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care*, 33 (9), pp. 2021-2023.

Premaor, M. O. E & Furlanetto, T. W. (2006). Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 50 (1), pp. 25-37.

Reichrath, J. (2009). Skin cancer prevention and UV-protection: how to avoid vitamin D-deficiency? *British Journal of Dermatology*, 161 (suppl 3), pp. 54-60.

Reis, J. P. *et al.* (2009). Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population. *Pediatrics*, 124 (3), pp. e371-e379.

Rejnmark, L. *et al.* (2012). Vitamin D with Calcium Reduces Mortality: Patient Level Pooled Analysis of 70,528 Patients from Eight Major Vitamin D Trials. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97 (8), pp. 2670-2681.

Rejnmark, L. *et al.* (2009). Reduced Prediagnostic 25-Hydroxyvitamin D Levels in Women with Breast Cancer: A Nested Case-Control Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18 (10), pp. 2655-2660.

Romagnoli, E. *et al.* (2008). Short and Long-Term Variations in Serum Calcitropic Hormones after a Single Very Large Dose of Ergocalciferol (Vitamin D₂) or

- Cholecalciferol (Vitamin D3) in the Elderly. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93 (8), pp. 3015-3020.
- Rosen, C. J. (2011). Vitamin D Insufficiency. *New England Journal of Medicine*, 364 (3), pp. 248-254.
- Rosenfeld, L. (1997). Vitamine—vitamin. The early years of discovery. *Clinical Chemistry*, 43 (4), pp. 680-685.
- Rossi, M. *et al.* (2009). Vitamin D intake and breast cancer risk: a case-control study in Italy. *Annals of Oncology*, 20 (2), pp. 374-378.
- Saenger, A. K. *et al.* (2006). Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 Using HPLC-Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency. *American Journal of Clinical Pathology*, 125 (6), pp. 914-920.
- Sanders, K. M. *et al.* (2010). Annual high-dose oral vitamin d and falls and fractures in older women: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 303 (18), pp. 1815-1822.
- Santos, A. (2011). Papel da vitamina D no risco cardiovascular. *Revista Factores de Risco*, 23, 18-23.
- Schuch, N. J., Garcia, V. C. & Martini, L. A. (2009). Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53 (5), pp. 625-633.
- Scragg, R., Sowers, M. & Bell, C. (2007). Serum 25-hydroxyvitamin D, Ethnicity, and Blood Pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Hypertension*, 20 (7), pp. 713-719.
- Seammans, K. M. & Cashman, K. D. (2009). Existing and potentially novel functional markers of vitamin D status: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89 (6), pp. 1997S-2008S.
- Silva, J. M. E. (2007). Brief history of rickets and of the discovery of vitamin D. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 32 (3), pp. 205-229.

- Sneve, M., Figenschau, Y. & Jorde, R. (2008). Supplementation with cholecalciferol does not result in weight reduction in overweight and obese subjects. *European Journal of Endocrinology*, 159 (6), pp. 675-684.
- Snijder, M. B. *et al.* (2005). Adiposity in Relation to Vitamin D Status and Parathyroid Hormone Levels: A Population-Based Study in Older Men and Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90 (7), pp. 4119-4123.
- Souberbielle, J.-C.*et al.* (2010). Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmunity Reviews*, 9 (11), pp. 709-715.
- Sugden, J. A. *et al.* (2008). Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabetic Medicine*, 25 (3), pp. 320-325.
- Sun, X. & Zemel, M. B. (2008). $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *International Journal of Obesity*, 32 (8), pp. 1305-1311.
- Thacher, T. D., E & Clarke, B. L. (2011). Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clinic Proceedings*, 86 (1), pp. 50-60.
- Urrutia-Pereira, M., E & Solé, D. (2015). Deficiência de vitamina D na gravidez e o seu impacto sobre o feto, o recém-nascido e na infância. *Revista Paulista de Pediatria*, 33 (1), pp. 104-113.
- Van Den Ouweland, J. M. W. *et al.* (2010). Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *Journal of Chromatography B*, 878 (15-16), pp. 1163-1168.
- Venning, G. (2005). Recent developments in vitamin D deficiency and muscle weakness among elderly people. *British Medical Journal*, 330 (7490), pp. 524-526.
- Vieth, R. (1999). Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (5), pp. 842-856.
- Wactawski-Wende, J. *et al.* (2006). Calcium plus Vitamin D Supplementation and the Risk of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 354 (7), pp. 684-696.

- Wallace, A. M. *et al.* (2010). Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids*, 75 (7), pp. 477-488.
- Wang, L. *et al.* (2010). Systematic Review: Vitamin D and Calcium Supplementation in Prevention of Cardiovascular Events. *Annals of Internal Medicine*, 152 (5), pp. 315-323.
- Wang, T. J. *et al.* (2008). Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*, 117 (4), pp. 503-511.
- Watson, K. E. *et al.* (1997). Active Serum Vitamin D Levels Are Inversely Correlated With Coronary Calcification. *Circulation*, 96 (6), pp. 1755-1760.
- Wimalawansa, S. (2012). Vitamin D in the New Millennium. *Current Osteoporosis Reports*, 10 (1), pp. 4-15.
- Wolf, G. (2004). The Discovery of Vitamin D: The Contribution of Adolf Windaus. *The Journal of Nutrition*, 134 (6), pp. 1299-1302.
- Wolpowitz, D., E & Gilchrest, B. A. (2006). The vitamin D questions: How much do you need and how should you get it? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54 (2), pp. 301-317.
- Wong, G. *et al.* (2015). Vitamin D and cancer mortality in elderly women. *BMC Cancer*, 15, pp.106.
- Wootton, A. M. (2005). Improving the Measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clinical Biochemist Reviews*, 26 (1), pp. 33-36.
- Yin, L. *et al.* (2010). Meta-analysis: serum vitamin D and breast cancer risk. *European Journal of Cancer*, 46 (12), pp. 2196-2205.
- Zipitis, C. S. & Akobeng, A. K. (2008). Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood*, 93 (6), pp. 512-517.
- Zittermann, A. (2003). Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *British Journal of Nutrition*, 89 (5), pp. 552-572.